GEWINNUNG UND FRAKTIONIERUNG VON LIGNIN-POLYSACCHARID-KOMPLEXEN

Ein Beitrag zur Aufklärung der Lignin-Polysaccharid-Bindung in der verholzten Zellwand

Josef Feckl

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547022_0043

GEWINNUNG UND FRAKTIONIERUNG VON LIGNIN-POLYSACCHARID-KOMPLEXEN

Ein Beitrag zur Aufklärung der Lignin-Polysaccharid-Bindung in der verholzten Zellwand

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Forstwissenschaft an der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Diplom-Chemiker

Josef Feckl

aus München

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof.Dr. D. Fengel
2. Berichterstatter: Prof.Dr. M. Zenk
3. Berichterstatter: Prof.Dr. P. Schütt

Tag der mündlichen Prüfung: 23.7.1981

Inhalt

	Seite
Vorwort	1
1. Die Morphologie der verholzten Zellwand	3
2. Die Hauptbestandteile der Zellwand	5
2.1 Allgemeines	5
2.2 Cellulose	7
2.3 Andere Polysaccharide	8
2.3.1 Vorkommen, molekularer Aufbau und Biosynthese	8
2.3.2 Isolierung	14
2.3.3 Strukturaufklärung	15
2.4 Lignin	16
2.4.1 Biosynthese und Verteilung in der Zellwand	16
2.4.2 Isolierung und Charakterisierung	25
2.4.3 Abbau	27
2.5 Lignin-Polysaccharid-Komplexe	29
2.5.1 Allgemeine Beschreibung	29
2.5.2 Syntheseversuche	29
2.5.3 Lignin-Polysaccharid-Komplexe im Holz	33
2.5.4 Untersuchungsmethoden und Ergebnisse	34
2.5.5 Hypothesen zur Lignin-Polysaccharid-Bindung und ihrer Bedeutung im Gefüge der Zellwand	38
2.6 Ziele der vorliegenden Arbeit	41
3. Entwicklung von Arbeitsmethoden: Voraussetzungen, Probleme und Ergebnisse	43
3.1 Allgemeines	43
3.2 Abbau- und Extraktionsmethoden	44
3.3 Dünnschicht-Chromatographie	45
3.4 Chromatographie an Ionenaustauschern	47
3.5 Chromatographie an Hydroxylapatit	48

Seite

3.6 Gelfiltrations- oder Gelpermeations-chromatographie 49

3.7 Lignin-Bestimmung 54

3.8 Infrarot-Spektroskopie 56

3.8.1 Voraussetzungen 56

3.8.2 Qualitative Interpretation 57

3.8.3 Entwicklung einer Methode zur quantitativen Ligninbestimmung 59

3.9 Literaturerfassung 65

4. Syntheseversuche: Katalytische Dehydrierung von Coniferylalkohol in Gegenwart von Arabinose 66

4.1 Peroxidase als Katalysator in wäßriger Lösung 66

4.1.1 Wahl der Versuchsbedingungen 66

4.1.2 Untersuchungen an den Produkten 68

4.2 Ein Kupfer-Ethylendiamin-Komplex als Katalysator in DMSO-Lösung 72

4.2.1 Wahl der Versuchsbedingungen 72

4.2.2 Untersuchungen an den Produkten 74

5. Versuche zur Fraktionierung des Alkali-Extraktes aus der Holocellulose 76

5.1 Erste Stufe: Trennung in ligninreiche und polysaccharidreiche Anteile 76

5.1.1 Entwicklung und Durchführung der Trennung 76

5.1.2 Untersuchung des polysaccharidreichen Anteils "HAP" 82

5.1.3 Untersuchung des ligninartigen Anteils "HAL I" 84

5.1.4 Untersuchung des ligninartigen Anteils "HAL II" 86

5.2 Zweite Stufe: Fraktionierung der Komponente HAL II 88

5.2.1 Chromatographie an Hydroxylapatit 88

5.2.2 Untersuchung der Fraktionen 91

5.3 Dritte Stufe: Fraktionierungsversuche an einigen LAC-Fraktionen 97

Seite

5.3.1 Präparative Gelfiltrationschromatographie 97

5.3.2 Chromatographie an Kationenaustauscher 100

5.4 Vierte Stufe: Gelfiltrationschromatographie der Fraktionen aus der Kationenaustauscher-Trennung 102

6. Diskussion und Zusammenfassung der Ergebnisse 104

6.1 Arbeitsweise 104

6.2 Syntheseversuche 106

6.3 Fraktionierung des Alkali-Extraktes aus der Holocellulose 110

6.4 Zusammenfassung 114

7. Materialien, Geräte und Arbeitsvorschriften 117

7.1 Holz 117

7.2 Lösungsmittel, Reagenzien und andere Chemikalien 117

7.3 Arbeitsweise Dünnschichtchromatographie 118

7.4 Säulenchromatographie 120

7.5 Delignifizierung 123

7.6 Gewinnung und Aufarbeitung des Alkali-Extraktes aus der Holocellulose 123

7.7 Infrarot-Spektroskopie 124

7.8 Verschiedenes 126

8. Infrarot-Spektren 127

9. Literatur 138

Vorwort

Eine der wichtigsten Funktionen des Waldes ist die Produktion von Nutzholz. Der Gesamteinschlag der Bundesrepublik Deutschland betrug im Jahr 1979 über 27 Mio m^3. Davon wurden etwa 6 Mio m^3 von der Papier- und Zellstoffindustrie verwertet, für die das Holz einen wichtigen Rohstoff darstellt, der auch chemisch weiterverarbeitet wird. Diese Zahlen machen die Bedeutung der Untersuchung des Holzes und seiner chemischen Bestandteile für die Forstwissenschaft klar. Diese ist aber nicht nur auf den Gesichtspunkt Verwertung beschränkt: auch über Einflüsse auf das Leben und Wachstum des Baumes und des Waldes können vergleichende chemische Untersuchungen wichtige Aussagen liefern.

Die Art der Bindung zwischen den beiden Hauptbestandteilen der verholzten Zellwand, dem Lignin und den Polysacchariden, ist seit langem Gegenstand der Forschung, da sie ein wichtiges Glied im übermolekularen Gefüge darstellt. Zahlreiche, of widersprüchliche Ergebnisse und Spekulationen wurden darüber veröffentlicht. Möge die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur Klärung des Problems liefern!

Die Arbeit entstand in der Zeit von Dezember 1977 bis Mai 1981 in der Abteilung Chemie und Ultrastrukturforschung am Institut für Holzforschung der Universität München unter der Anleitung von Herrn Prof.Dr. D. Fengel. Sein Vertrauen und seine aufmerksame Betreuung bei der experimentellen Arbeit schufen optimale Voraussetzungen für die Bearbeitung der nicht immer einfach lösbaren Probleme. Seine Beratung trug viel zu einer raschen Abfassung des vorliegenden Manuskripts bei. Die angenehme und offene Atmosphäre in der Arbeitsgruppe war eine weitere wichtige Voraussetzung für einen bestmöglichen Verlauf der Laborarbeit. Stellvertretend für alle seien Herr Dr. G. Wegener genannt, dessen selbstlose Hilfsbereitschaft mir manche Schwierigkeiten meistern half, und Frau M. Przyklenk, die mit der Durchführung einiger spektroskopischer Untersuchungen einen besonderen Beitrag zu der Arbeit lieferte.

Die Mitarbeiter der Werkstätten des Instituts trugen mit der Anfertigung von zahlreichen größeren und kleineren Dingen ebenfall zum Gelingen der Arbeit bei. Das Manuskript wurde von Frl. Ch. Jenke geschrieben, die photographischen Arbeiten wurden von Frau H. Bauer und - zum überwiegenden Teil - von Herrn R. Rosin durchgeführt. Ihre rasche Hilfe bei der Fertigstellung des Manuskript muß besonders lobend erwähnt werden.

Auch einiger Helfer aus anderen Instituten muß an dieser Stelle gedacht werden: Herr Doz. Dr. J. Stöckigt vom Institut für Pharmazeutische Arzneimittel half mir bei Literatursuche, die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Zundel am Institut für physikalische Chemie, Herr B. Vogt und Herr Dr. W. Kristof, waren mir bei der Entwicklung der Methode zur quantitativen Infrarotspektroskopie behilflich, und Mitarbeiter des Instituts für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie (Arbeitsgruppe Prof. G. von Jagow) stellten mir den Hydroxylapatit aus ihren Vorräten zur Verfügung.

Schließlich muß noch Herr H. Zeisler genannt werden, der das Manuskript auf seine "Lesbarkeit" hin überprüft hat. Alle Helfer, die ich zu nennen vergessen habe, bitte ich, mir das Versehen zu verzeihen.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft übernahm im Rahmen des Forschungsvorhabens Fe 136/6 die Finanzierung einiger Geräte, des Verbrauchsmaterials und nicht zuletzt auch des Lebensunterhalts des Bearbeiters.

Allen genannten, ohne deren Unterstützung und Mithilfe die Durchführung und der Abschluß der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre, möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen.

München, im Mai 1981 Josef Feckl

1. Die Morphologie der verholzten Zellwand

Beim Betrachten des Erscheinungsbildes der verholzten Zellwand im Licht- und Elektronenmikroskop zeigen sich, entsprechend der Pflanzenart und der Funktion der Zellen, deutliche Unterschiede. Zwei grundlegende Bauprinzipien sind jedoch allen gemeinsam: zum einen setzt sich die Zellwand aus mehreren, schalenförmig angeordneten Schichten zusammen, zum anderen ist in diesen Schichten eine Feinstruktur zu erkennen, nämlich geordnet erscheinendes Material, die sogenannten Fibrillen, die in eine amorphe "Matrix" eingebettet sind. Das amorphe Material wird als "Inkrusten" bezeichnet, falls es sich um Substanzen handelt, die erst nach der Bildung der Fibrillen eingelagert werden, wie z.B. Lignin.

Die Zellen werden im Gewebeverband von der Mittellamelle zusammengehalten. Die daran nach innen anschließende Primärwand enthält einen relativ geringen Anteil an Fibrillen, die keine oder nur geringe Orientierung besitzen ("Streutextur"). Der Übergang von der Mittellamelle zur Primärwand scheint fließend zu sein, die beiden Schichten werden daher häufig als "Mittelschicht" zusammengefaßt. Die Sekundärwand besteht überwiegend aus Fibrillen; sie ist aus mindestens zwei Schichten aufgebaut, die sich in der Orientierung der Fibrillen unterscheiden. Diese sind parallel schraubenförmig um die Zelle gewunden ("Paralleltextur") und bilden in der Sekundärwand 1 ("S 1") einen Winkel von 70 - 90° mit der Zellachse, in der Sekundärwand 2 ("S 2") einen Winkel von 5 - 30°. Beide Wandschichten zerfallen wieder in Lamellen, in denen die Fibrillen in vielen Fällen abwechselnd gegenläufig angeordnet sind. Während die Primärwand noch plastisch verformbar ist und ein Wachstum der Zelle erlaubt, wird die Zellwand durch die Bildung der Sekundärwand starr. Die S 2 bildet die Hauptmasse der gesamten Zellwand (75 - 90%). In einigen Zellarten (Parenchymzellen) kommt auch eine Sekundärwand 3 vor. Die

Tertiärwand ist relativ dünn und die Fibrillen sind weniger streng geordnet. An der Innenseite der Zellwand können noch verschiedene Auflagerungen vorhanden sein (Warzen, Leisten u.ä.), die arttypisch sind und wichtige Hinweise für die mikroskopische Identifizierung der Holzarten liefern. Die Abbildung 1 I zeigt schematisch den Aufbau der Zellwand.

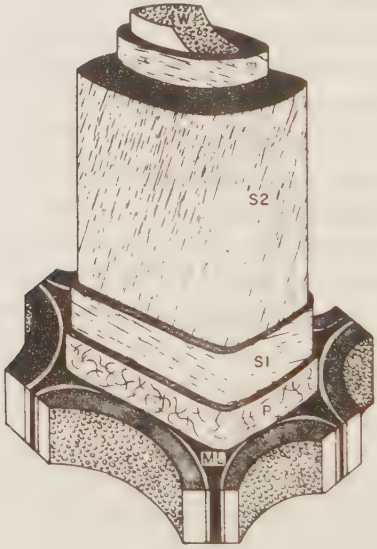


Abb. 1 I. Schematische Darstellung des Aufbaus der Zellwand aus Mittellamelle (ML), Primärwand (P), zwei Sekundärwand-Schichten (S1, S2), Tertiärwand (T) und Warzenschicht (W).

2. Die Hauptbestandteile der Zellwand

2.1 Allgemeines

Im Folgenden sollen einige Bestandteile der Zellwand etwas genauer beschrieben werden, und zwar diejenigen, die für ihre mechanische Stabilität verantwortlich sind und damit die typische Erscheinungsform des Holzes verursachen. Nicht berücksichtigt werden unter anderem Salze, Proteine und die sogenannten "Extraktstoffe" (die Stoffe, die sich mit organischen Lösungsmitteln aus dem unveränderten Holz extrahieren lassen) obwohl diese durchaus Bedeutung für das Holz haben, z.B. als Schutz gegen die Angriffe von Mikroorganismen (Blažej et al. 1979, Bir Mullick 1977). Extraktstoffe sind größtenteils von niederer Molekülmasse, während die "tragenden" Bestandteile Polymere sind. An erster Stelle sei die Cellulose genannt, aus der die Fibrillen der Zellwand bestehen. Das Matrix- und inkrustierte Material ist aus anderen Polysacchariden ("Holzpolyosen") und Lignin zusammengesetzt. Vor allem dem letzteren wird die Druckstabilisierung als Funktion zugeschrieben, während die Cellulose die Zugfestigkeit bedingt und die Polyosen als Vermittler zwischen beiden dienen. Der relative Anteil der verschiedenen Komponenten an der Gesamtmasse des Holzes kann sehr unterschiedlich sein (Tab. 2 I).

Für Untersuchungen zur Chemie seiner Hauptbestandteile wird fast immer das Holz als einheitliches Material betrachtet und aufgearbeitet, d.h. es erfolgt keine Differenzierung, etwa nach den verschiedenen Zellschichten, obwohl dabei beträchtliche Unterschiede zu erwarten sind (Hardell et al. 1980 a, b; Cho et al. 1980). Hier stehen methodische Schwierigkeiten im Wege. Neben natürlich gewachsenem Gewebe werden neuerdings auch Zellkulturen untersucht, vor allem wenn Fragen über die Biosynthese geklärt werden sollen (Albersheim et al. 1973; Hahlbrock und Grisebach 1979; Mouttet und

Tab. 2 I. Einige Beispiele für die Anteile der Hauptbestandteile bei verschiedenen Hölzern.(nach Fengel, 1977)

Holzart	Cellulose %	Lignin %	Polyosen %	Extr.st. %	Asche %
Fichte	40	28	29	2,5	0,5
Kiefer	39	26	31	3,3	0,4
Lärche	42	25	30	2,0	0,2
Tanne	40	30	26	2,8	1,1
Ahorn	40	22	36	1,3	0,4
Birke	45	20	31	2,0	0,3
Buche	40	23	35	1,2	0,5
Pappel	42	20	35	2,5	0,3
Angelique	45	32	15	5,4	0,6
Teak	37	30	12	12,2	1,4
Mahagoni	40	24	16	16,3	0,6

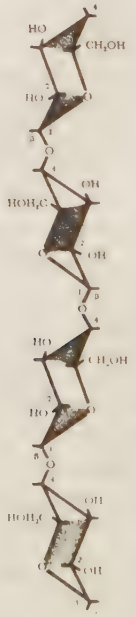


Abb. 2 I. Ausschnitt aus einem Cellulosemolekül.

Robert 1978).

Leider liegen über die Chemie der Zellwandbestandteile keine vollständigen Darstellungen aus neuerer Zeit vor. Die bis 1975 erschienene Literatur über die allgemeine chemische Zusammensetzung zahlreicher Hölzer wurde von Fengel und Grosser zusammengestellt (Fengel und Grosser 1975). Eine detaillierte Darstellung über die Chemie des Lignins, die etwa den Wissensstand um 1970 wiedergibt, wurde von Sarkanen und Ludwig herausgegeben. Das Buch über Biopolymere von Ebert (1980) enthält ein Kapitel über Cellulose und andere Polysaccharide, die Chemie der Polyosen ist - entsprechend den Kenntnissen um 1972 - in einem Abschnitt des Buches "Chemie des Holzes" einer slowakischen Arbeitsgruppe beschrieben worden. Verschiedene ausgewählte Kapitel aus der Chemie der Holzbestandteile sind in Band 11 der Serie "Recent Advances in Phytochemistry" (1977) dargestellt.

Die folgenden Abschnitte bringen eine kurze Zusammenfassung über die Chemie von Cellulose, anderen Polysacchariden und Lignin, soweit sie zum Verständnis der Versuche an Lignin-Polysaccharid-Komplexen nötig ist. Eingefügt sind einige Hinweise auf Veröffentlichungen, die einzelne Probleme ausführlicher darstellen oder über Forschungsergebnisse aus neuerer Zeit berichten. In diesen sind in der Regel Angaben über weiterführende Literatur zu dem betreffenden Problem zu finden.

2.2 Cellulose

Der elementare Baustein des Polysaccharids Cellulose ist das Glucose-Molekül. Zahlreiche dieser Moleküle sind durch die ß-(1→4)-glycosidische Bindung zu einer Kette verbunden ("1,4-Glucan", Abb. 2 I). Diese Art der Bindung macht es möglich, im Gegensatz zu der bei den Reservepolysacchariden Amylose, Amylopectin und Glycogen üblichen α-(1→4)-Bindung, ein gestrecktes Makromolekül zu bilden.

Die Länge der Kette wird durch keinen Biosynthese-Mechanismus festgelegt, folglich kann für die Cellulose keine bestimmte Molekülmasse angegeben werden. Die Größe der Moleküle wird durch einen Mittelwert charakterisiert, meist durch den sogenannten "Durchschnitts-Polymerisationsgrad" (kurz DP), das ist die Zahl der Glucose-Moleküle, die durchschnittlich in einem Makromolekül vorhanden sind.

Eine starke Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Cellulosemolekülen bewirkt eine stabile Zusammenlagerung, die letztlich die im Licht- und Elektronenmikroskop sichtbaren Fibrillen formt (Abb. 2 II). Ob diese aus regelmäßigen Untereinheiten aufgebaut sind, ist fraglich (Fengel 1978). Ein hoher Anteil der Cellulose liegt in der Zellwand im kristallinen Zustand vor - eine weitere Folge der Wasserstoffbrückenbindung.

Um Cellulose aus Holz untersuchen zu können, müssen die anderen Bestandteile zunächst entfernt werden. Lignin kann dazu oxidativ abgebaut werden, und die Polyosen lassen sich z.B. mit Alkali extrahieren. Zurück bleibt die sogenannte α-Cellulose, die allerdings noch keine reine Cellulose darstellt und möglicherweise schon abgebaut ist. Ihr DP liegt unter 2000.

2.3 Andere Polysaccharide

2.3.1 Vorkommen, molekularer Aufbau und Biosynthese

Neben der Cellulose kommen in der Zellwand noch andere Polysaccharide vor, sie können in der Mittellamelle und der Primärwand bis zu 50% des gesamten Materials ausmachen. Diese sehr verschiedenartigen Substanzen werden unter den etwas irreführenden Bezeichnungen "Hemicellulosen" oder "Polyosen" zusammengefaßt. Ihr Vorkommen ist art- und organspezifisch unterschiedlich (Blažej et al. 1979, Aspinall 1973). Es han-

Abb. 2 II. Cellulosefibrillen in Zellwandbruchstücken aus Fichtenholz, Vergrößerung etwa 175 000-fach (Transmissions-Elektronenmikroskop-Aufnahme von D. Fengel).

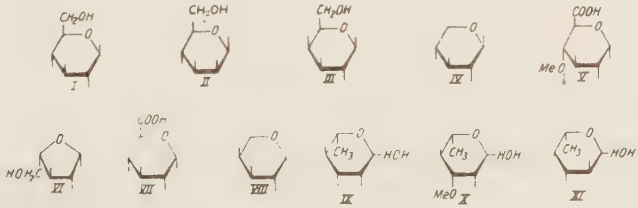


Abb. 2 III. Die häufigsten, am Aufbau der Holzpolyosen beteiligten Zucker: I. Glucose, II. Mannose, III. Galactose, IV. Xylose V. 4-O-Methyl-Glucuronsäure, VI. Arabinofuranose, VII. Glucuronsäure VIII. Arabinopyranose, IX. Rhamnose, X. 3-O-Methyl-Rhamnose, XI. Fucose.

delt sich hauptsächlich um Mischpolymere mit meist komplizierten, verzweigten Strukturen, von denen nur einige vollständig aufgeklärt sind. Einheitliche Polymere aus einem Zucker sind im Holz selten. Die Abb. 2 III zeigt die Zucker, die als Bausteine gefunden wurden. Man kann sie in Pentosen, Hexosen und Uronsäuren unterteilen. Im Makromolekül liegen alle (soweit bekannt) in der Pyranose-Form (sechsgliedriger Ring) vor, ausgenommen die Arabinose, die häufiger in der Furanose-Form (fünfgliedriger Ring) vorliegt. Teilweise sind die Hydroxylgruppen acetyliert. Die Tabelle 2 II zeigt den Aufbau einiger Hexosane und Pentosane. Der Aufbau einiger Polyosen, die bei den Versuchen an Fichten- und Buchenholz eine besondere Rolle spielen, ist in der Abb. 2 IV im Detail dargestellt.

Das Galactoglucomannan kommt in einem Anteil von 12 - 18% im Nadelholz vor. Mannose und Glucose sind ß-(1→4) glycosidisch zu einer Kette verbunden, die aus etwa 150 Zuckern besteht; sie kann mit ß-(1→6)-glycosidischer Bindung ein- bis zweimal verzweigt sein. An diese Kette, vor allem an die Mannose, sind die Galactose-Einheiten α-(1→6)-glycosidisch gebunden. Die OH-Gruppen am C_2 und C_3 der Mannose sind teilweise acetyliert. Bei dem alkalilöslichen Galactoglucomannan aus der Fichte beträgt das Verhältnis Mannose : Glucose : Galactose etwa 3 : 1 : 0,1.

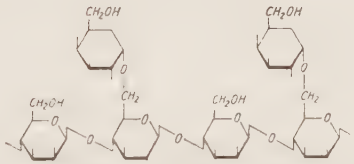
Das 4-O-Methyl-Glucurono-Arabinoxylan kommt in einem Anteil von 10 - 15% im Nadelholz vor. Die Hauptkette dieser Polyose bilden ß-(1→4)-glycosidisch verknüpfte Xylosemoleküle, an die die 4-O-Methylglucuronsäure α-(1→2)-glycosidisch und die Arabinose α-(1→3)-glycosidisch gebunden sind. Die Arabinose liegt in der Furanose-Form vor. Das Verhältnis Xylose : Arabinose : 4-O-Methylglucuronsäure ist etwa 10 : 1,3 : 2.

Das 4-O-Methylglucurono-Xylan kommt in Anteilen von 10 - 35% in Laubhölzern vor. Die Xylanmoleküle sind ß-(1→4)-glycosidisch verbunden, die Kette hat einige wenige Verzweigungen

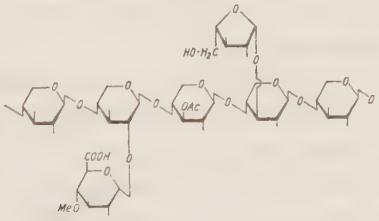
Tab. 2 II. Zusammensetzung einiger häufiger Holzpolyosen

Polysaccharid	Vorkommen	Anteil (%) (extrah. Holz)	Struktureinheit	relatives Auftreten	Glycosid-Bindung
O-Acetyl-(4-O-Methyl-glucurono)-Xylan	Laubbäume	20 - 35	β-D-Xyl(p) 4-O-Me-α-D-GU(p) O-Acetyl	10 1 7	1→4 1→2
Glucomannan	Laubbäume	3 - 5	β-D-Man(p) β-D-Glu(p)	1 - 2 1	1→4 1→4
Arabino-(4-O-Methyl-glucurono)-Xylan	Nadelbäume	10 - 15	β-D-Xyl(p) 4-O-Me-α-D-GU(p) L-Ara(f)	10 2 1,3	1→4 1→2 1→3
Galactoglucomannan (wasserlöslich)	Nadelbäume	5 - 10	β-D-Man(p) β-D-Glu(p) β-D-Gal(p) O-Acetyl	3 1 1 0,24	1→4 1→4 1→6
Galactoglucomannan (alkalilöslich)	Nadelbäume	10 - 15	β-D-Man(p) β-D-Glu(p) α-D-Gal(p) O-Acetyl	3 1 0,1 0,24	1→4 1→4 1→6
Arabinogalactan	Lärchen	10 - 20	β-D-Gal(p) L-Ara (f) β-L-Ara(p) β-G-Glu(p)	6 0,66 0,33 gering	1→3, 1→6 1→6 1→3 1→6

Galactoglucomannan



4-O-Methyl-Glucurono-Arabinoxylan



4-O-Methyl-Glucurono-Xylan

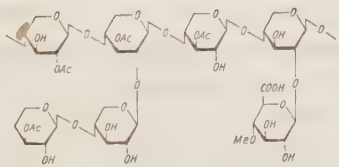


Abb. 2 IV. Ausschnitte aus der Molekülstruktur einiger häufiger Holzpolyosen (nach Blažej et al.1979).

mit ß-(1→3)-glycosidischer Bindung. Die 4-O-Methylglucuronsäure ist durch eine α-(1→2)-glycosidische Bindung an diese Kette gebunden. Das Verhältnis Xylose : 4-O-Methylglucuronsäure ist etwa 10 : 1. Etwa 7 von 10 Xylosemolekülen sind in 3-Stellung acetyliert.

Die Strukturen wurden in den Jahren um 1960 aufgeklärt (Timell 1967), und die dabei verwendeten Methoden sind im wesentlichen auch heute noch üblich (Fukuda und Hamada 1978, Jones 1978, Simson und Timell 1978). Der Durchschnittspolymerisationsgrad der Polyosen ist erheblich niedriger als bei der Cellulose, er liegt im allgemeinen zwischen 50 und 200, maximal bei 600.

Vor allem die Acetylierung der Hydroxylgruppen macht es unmöglich, daß sich zwischen den Polyosenmolekülen im selben Maße Wasserstoffbrücken ausbilden wie bei der Cellulose. Sie sind daher im natürlichen Zustand amorph. Im isolierten Zustand können jedoch Mannane sowie Xylane nach der Abspaltung der Acetylgruppen ebenfalls kristalline Strukturen bilden (Meier 1958, Marchessault et al. 1961).

Als gesonderte Gruppe werden gelegentlich die "Pectine" zusammengefaßt. Zu ihnen werden neben der Pectinsäure (Polygalacturonsäure) auch ihre Derivate sowie Galactane und Arabinane gerechnet.

Die ersten und bisher häufigsten Untersuchungen über die Biosynthese von Polysacchariden wurden an Bakterien vorgenommen; insbesondere Details über Mechanismen sind daher bekannt (Robyt 1979). Die dabei gewonnenen Erkenntnisse waren auch Grundlage für die Versuche an den Zellwänden höherer Pflanzen, die als schwer zu bearbeitendes Material nicht so häufig Gegenstand der Forschung waren. Es gilt heute als sicher, daß Polysaccharide aus Nucleosid-Diphosphaten aufgebaut werden (Delmer 1977, Franz 1978). Dabei spielen verschiedene Nucleoside eine Rolle (Tab. 2 III). Die an der Biosynthese beteiligten Enzyme sind an Membranen gebunden und konnten bisher

Tab. 2 III. Nucleosid-Diphosphate und Polysaccharide, die aus ihnen aufgebaut werden (nach Franz 1978).

aktivierter Baustein	Polysaccharid
UDP-Galacturonsäure	Polygalacturonsäure
UDP-Arabinose	Arabinan
UDP-Xylose	Xylan
UDP-Xylose, UDP-Glucose	Xyloglucan
UDP-Galactose	Galactan
GDP-Mannose	Mannan
GDP-Mannose, GDP-Glucose	Glucomannan
UDP-Glucose	Glucan (ß-1,3 u. ß-1,4)
GDP-Glucose	Glucan (ß-1,4)

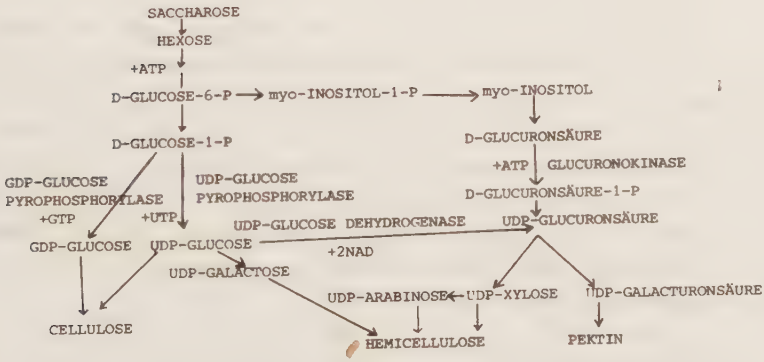


Abb. 2 V. Umwandlung der Zucker im Zellmetabolismus zur Bildung von Polysacchariden (nach Franz 1978)

nicht rein isoliert werden, jedoch bleibt ihre Aktivität in gereinigten Membranfragmenten noch bis zu einem gewissen Grad erhalten. Vermutlich findet die Bildung der Polyosen am Golgi-Apparat statt, die der Cellulose dagegen am Plasmalemma.

Zwei Mechanismen für die Polymerisation sind bekannt, die auch in der Zellwand eine Rolle spielen können (Robyt 1979). In einem Fall wird der "aktivierte Baustein" (das Nucleosid-Diphosphat) an das nicht reduzierende Ende einer vorhandenen Kette angehängt, im anderen Fall wird er zwischen das reduzierende Ende und ein Trägermolekül, an dem dieses befestigt ist, eingeschoben. Glycolipide und Glycoproteine, die möglicherweise als solche "Träger"- oder "Starter"-Moleküle dienen, sind isoliert worden (Franz 1978, Elbein 1979, Elbein und Forsee 1973). Auf ihre Rolle bei der Biosynthese weist die Beobachtung hin, daß ^{14}C-markierte Zucker bereits in diese Träger eingebaut werden, bevor sie in größerem Maße in den Zellwandpolysacchariden zu finden sind (Franz 1978).

Über die Regulation der Biosynthese ist nichts bekannt, d.h. es ist noch unklar, durch welche Mechanismen etwa die Länge einer Kette oder die Art und Häufigkeit der Verzweigungen geregelt wird und welche Faktoren die Biosynthesetätigkeit einleiten und abbrechen. Bekannt ist aber, daß, zumindest so lange die Zelle noch im Wachstum ist, gleichzeitig mit der Synthese auch Abbauvorgänge stattfinden. Eine schematische Übersicht über die Vorgänge bei der Polysaccharid-Biosynthese zeigt die Abb. 2 V.

2.3.2 Isolierung

Die direkte Extraktion von Polyosen aus chemisch unverändertem Gewebe ist möglich (Blažej et al. 1979, Lyubanskii 1978, Simson und Timell 1978), etwa bei verschiedenen Laubholzpolyosen. Meistens werden sie jedoch nach dem Abbau des Lignins

gewonnen, d.h. entweder aus der sogenannten "Holocellulose", bei der Lignin durch oxidativen Abbau entfernt worden ist, oder aus Produkten von Zellstoffprozessen (Sears et al. 1978). Dabei muß berücksichtigt werden, daß ein Teil der Polysaccharide zusammen mit den Ligninabbauprodukten verloren geht (Anderson und Samuelson 1978, Plonka und Surewitz 1979, Sjöström 1977, Wegener 1975). Die Extraktion erfolgt in der Regel mit Laugen, meist in mehreren Stufen, wobei sich insbesondere 5%ige und 24%ige Kalilauge bewährt haben (Wise und Ratcliff 1947, Fengel 1970, Fengel und Przyklenk 1976, Simson und Timell 1978). Der Extrakt, der normalerweise aus mehreren Komponenten besteht, kann durch Fällungsmethoden oder Chromatographie weiter fraktioniert werden (Blažej et al. 1979, Fengel und Przyklenk 1976, Fukuda und Hamada 1978, Fukuda et al. 1979, Sears et al. 1978). Die Gelpermeationschromatographie kann daneben auch noch zur Abschätzung der Molekülmasse benutzt werden (Simson und Timell 1978).

2.3.3 Strukturaufklärung

Für die Aufklärung der Struktur der Polyosen liegen nur wenige spektroskopische Daten vor (Lee et al. 1979). Die wichtigsten Erkenntnisse wurden aus Abbauversuchen gewonnen. Dabei steht an erster Stelle die Totalhydrolyse mit starken Säuren, die monomere Zucker liefert, welche sich chromatographisch trennen und quantitativ bestimmen lassen (Browning 1967, Fengel und Wegener 1979, Simson und Timell 1978). Die Säurebehandlung kann aber einen beträchtlichen Teil der Pentosen zerstören und damit die Analysenergebnisse verfälschen. Unter alkalischen Bedingungen findet keine Hydrolyse statt, sondern eine Folge von Eliminierungsreaktionen, durch die die Polysaccharidketten vermutlich vom Ende her "sequenzierend" abgebaut werden und deren Fortgang von der Art der Bindungen zwischen den Zuckern beeinflußt wird (Ericsson et al. 1977,

Johansson und Samuelson 1977 a, b, Sjöström 1977).

Für die Bestimmung von Art und Häufigkeit der Verzweigungen und der Verteilung der Monomeren im verzweigten Polymer ist eine Hydrolyse erforderlich, die Oligomere liefert, denen die charakteristischen Strukturelemente erhalten geblieben sind. Da die Bindungen zwischen verschiedenen Zuckern unterschiedlich schnell hydrolysiert werden, läßt sich das durch eine geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen erreichen. Daneben spielt die enzymatische Hydrolyse eine Rolle, insbesondere bei den allgemein labileren Pentosanen.

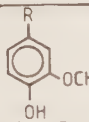
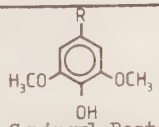
Durch Derivatisierung (Methylierung, Reduktion) können Hydroxyl- und Carboxylgruppen in charakteristischer Weise verändert werden, so daß nach dem Abbau der Derivate aus der Analyse der Bruchstücke Aussagen über die Struktur des Polymers gemacht werden können. Dasselbe gilt für die Untersuchung der Bruchstücke einer oxidativen Glycolspaltung (Browning 1976, Jones 1978).

2.4 Lignin

2.4.1 Biosynthese und Verteilung in der Zellwand

Lignin bildet etwa 20 bis 30% der gesamten Holzsubstanz; es kommt nach derzeitigem Wissen nie als alleiniges Bauelement von biologischem Material vor, sondern immer in Verbindung mit Polysacchariden. Lignin ist ein Polymer aus Derivaten des Zimtalkohols (Tab. 2 IV). Der Anteil der verschiedenen Bausteine ist dabei artspezifisch unterschiedlich. So wird das Verhältnis von Coniferyl- zu Sinapyl- und Cumarylalkoholanteilen für Fichtenholz u.a. mit 80 : 6 : 14 und 94 : 1 : 5 angegeben (Freudenberg und Neish 1968, Erickson et al. 1973), für Buchenholz mit 56 : 40 : 4 (Nimz 1974). Lignin aus Gräsern enthält bis zu 30% Anteile, die aus Coumarylalkohol entstanden sind (Sarkanen und Hergerth 1971). Die verschiedenen Analysenergebnisse wurden vor kurzem von Groß (1979) zusam-

Tab. 2 IV. Molekülstruktur und Nomenklatur einiger wichtiger Lignin-Bausteine und -Abbauprodukte.

	p-Hydroxy-Phenyl-Rest	 Guaiacyl-Rest	 Syringyl-Rest
R= -COH	p-Hydroxy-Benz-aldehyd	Vanillin	Syringaldehyd
R= -COOH	p-Hydroxy-Benzoe-säure	Vanillinsäure	Syringasäure
R=	Coumarylalkohol	Coniferyl-alkohol	Sinapylalkohol
R=	p-Coumarsäure	Ferulasäure	Sinapinsäure

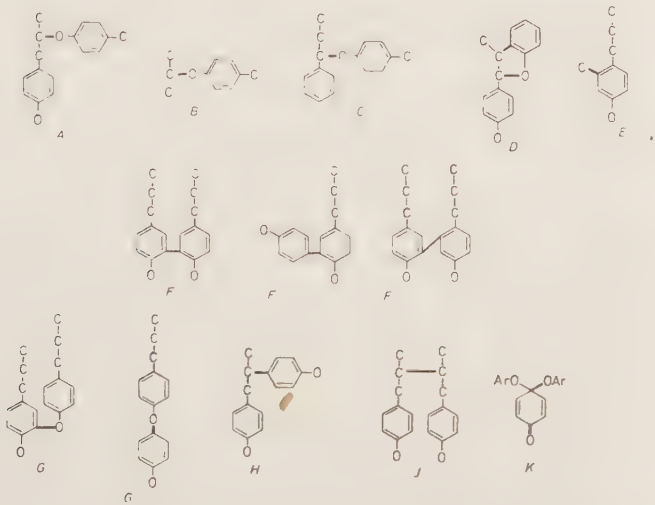


Abb. 2 VI. Möglichkeiten zur Bindung zwischen den Elementarbausteinen des Lignins (nach Adler 1977)

mengestellt. Die am häufigsten gefundenen Arten der Bindung zwischen den Elementarbausteinen zeigt die Abb. 2 VI. Der Typ A ("ß-O-4-Bindung") ist davon weitaus der häufigste, er macht z.B. bei der Fichte etwa 48%, während alle anderen zu weniger als 10% vertreten sind. Eine ausführliche Zusammenstellung der verschiedenen Bindungstypen findet sich z.B. in der Arbeit von Adler (1977).
Die Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin sind der Ausgangspunkt für die Biosynthese der Monomere (Abb. 2 VII). Auch die Regulation der Lignin-Produktion findet offenbar bei der Synthese der monomeren Bausteine statt. Insbesondere die Aktivität der Phenylalanin-Ammonialyasen scheint beeinflußbar zu sein, so z.B. durch Hormone und Lichteinwirkung (Groß 1977, 1979, Hahlbrock und Grisebach 1979, Kuboi und Yamada 1978, Alibert und Boudet 1979). Der unterschiedliche Anteil an Sinapylalkohol kann durch die Aktivität der 4-O-Methyltransferase verursacht sein, die bei Angiospermen eine weitere Methoxylierung von Ferulasäure katalysiert, bei Gymnospermen dagegen kaum (Grisebach 1977).

Die in Wasser nicht löslichen aromatischen Alkohole werden als Glycoside (z.B. Coniferin) im wäßrigen Medium der Zellen löslich, so daß sie vom Kambium, wo sie möglicherweise als Vorrat gespeichert werden, an den Ort der Lignin-Biosynthese transportiert werden können (Grisebach 1977). Die Glycoside werden aber offenbar nicht direkt in das Lignin eingebaut (Freudenberg und Neish 1968). Aus der Zellwand konnte eine Glycosidase isoliert werden, die die Bindung offenbar wieder spaltet (Marcinowski und Grisebach 1978, Marcinowski et al. 1979).

Im Gegensatz zur Synthese der Monomere wird die Polymerisation offenbar nicht enzymatisch gesteuert; Hinweise auf den möglichen Verlauf wurden vor allem durch Modellversuche gewonnen. Solche wurden in größerem Maße bereits um 1960 in der Arbeitsgruppe von K. Freudenberg in Heidelberg durchge-

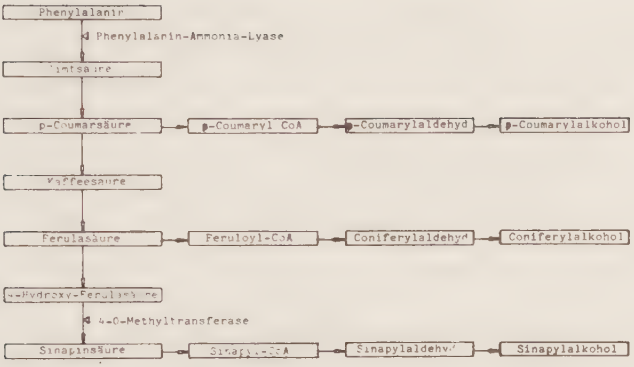


Abb. 2 VII. Biosynthese der monomeren Ligninbausteine

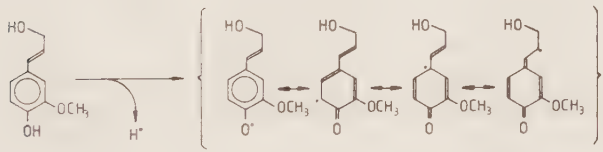


Abb. 2 VIII. Bildung des Phenoxy-Radikals aus Coniferylalkohol

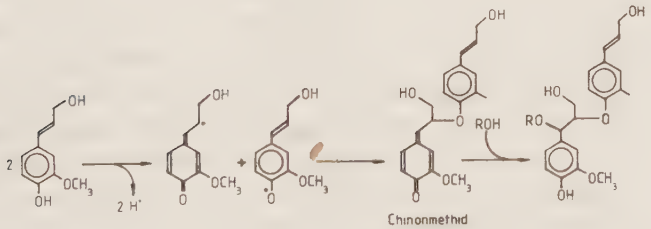


Abb. 2 IX. Bildung von Chinonmethiden aus Coniferylalkohol und ihre Reaktivität.

führt; sie führten zu einem synthetischen Lignin, das bei analytischen Untersuchungen mit dem aus biologischem Material identisch schien. Ferner liefern Syntheseprodukte, in die in ß-Stellung radioaktiv markierter Coniferylalkohol eingebaut worden war, dieselben markierten Abbauprodukte, wie natürliches Lignin, in das die markierte Verbindung über die Biosynthese gelangt war (Freudenberg und Neish 1968).

Aus den Ergebnissen wurde ein Modell für den Bau des Lignins entwickelt. Das heutige Bild von der Biosynthese geht nach wie vor von den damals entwickelten Vorstellungen aus. Danach ist der erste Schritt die enzymatische Dehydrierung der Zimtalkoholderivate (z.B. Coniferylalkohol). K. Freudenberg und seine Mitarbeiter benutzten dafür einen grob fraktionierten Enzym-Rohextrakt aus Pilzen (Agaricus campester), dessen wirksame Komponente eine Laccase ist (Enzym 1.10.3.2. nach Commission on Enzymes of the IUB, 1964), die mit Luftsauerstoff aus aromatischen Alkoholen ("Phenylpropan-Einheiten") Radikale bildet (Abb. 2 VIII). Die gleichen Radikale lassen sich auch mit Katalyse durch MnO_2, durch chemische Oxidationsmittel (Stoldere et al. 1978) oder durch Wasserstoffperoxid mit der katalytischen Wirkung einer Peroxidase (Enzym 1.11.1.7.) erzeugen. Sie sollten dann spontan, d.h. ohne weitere enzymatische Regelung, zum Lignin polymerisieren. In zahlreichen Versuchen konnten später aus den verschiedenen Monomeren definiertere und einheitlichere Produkte hergestellt werden ("Dehydrierungs-Polymerisate", kurz DHPs; Faix und Besold 1978, Gagnaire und Robert 1978, Lai und Sarkanen 1975, Yamasaki et al. 1978). Besondere Aufmerksamkeit galt der Synthese von di- und trimeren Reaktionsprodukten (Erickson und Miksche 1972, Kayama 1980, Nakatsubo und Higuchi 1975, Pew und Connors 1969) und kinetischen Untersuchungen (Kayama et al. 1980, Ozols-Kalnins et al. 1978). Aus den Radikalen kann ein weiteres reaktives Zwischenprodukt entstehen, das Chinonmethid (Abb. 2 IX; Freudenberg und Neish 1968, Leary 1976,

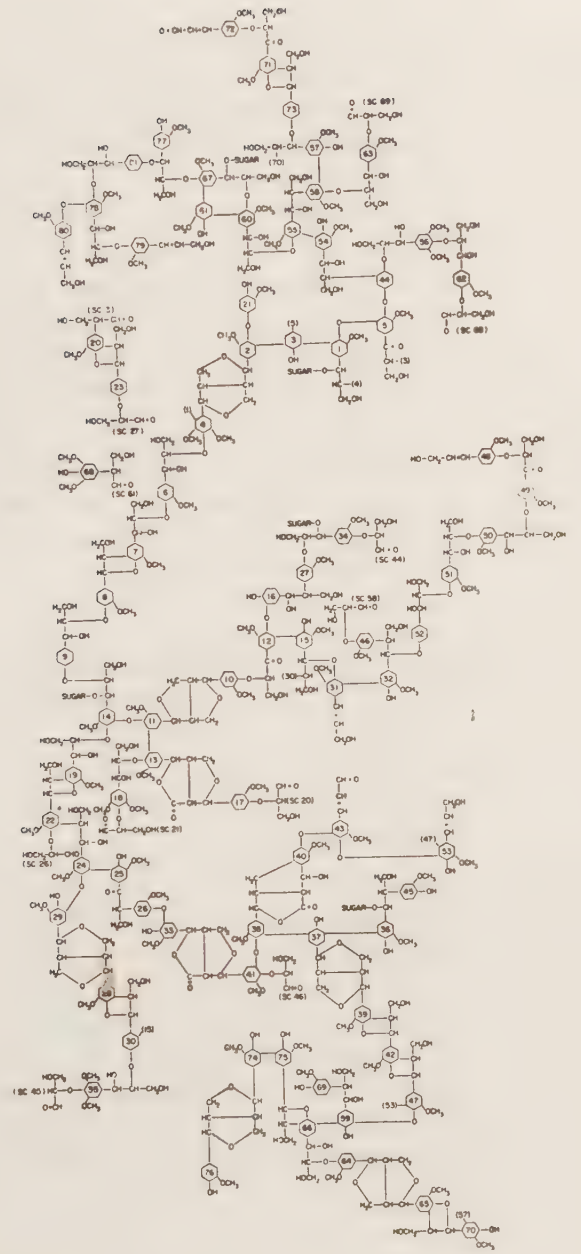


Abb. 2 X.
Strukturmodell des
Nadelholzlignins
(nach Glasser u.
Glasser 1974).

Nakatsubo 1976). Möglichkeiten und Wahrscheinlichkeiten für die Bindungen zwischen den Phenylpropaneinheiten waren (zusammen mit Abbauversuchen) die Grundlage zur Formulierung von Ligninmodellen, die auf einer statistischen Verteilung der gefundenen Einzelelemente beruhten (Abb. 2 X; Freudenberg und Neish 1968, Glasser und Glasser 1974, Nimz 1974, Sakakibara 1980).

Bei der Biosynthese wird demnach die Struktur des Polymers nur durch die Reaktivität und Häufigkeit der verschiedenen Radikale und Chinonmethide bestimmt, ein regelmäßiges Ordnungsprinzip würde fehlen - ein Gegensatz zu den anderen Biopolymeren.

Peroxidasen und ähnliche Enzyme konnten in der Zellwand nachgewiesen werden (Catesson 1978, Grisebach 1977, Groß 1977), ebenso Enzymsysteme, die Wasserstoffperoxid liefern und deren Aktivität offensichtlich auch einer Regelung unterliegt (Haliwell 1978, Mader und Schloß 1979). Abb. 2 XI faßt die derzeitigen Vorstellungen über den Polymerisationsvorgang zusammen. Über den Transport der Bausteine und Enzyme aus dem Cytoplasma durch das Plasmalemma in die Intercellularräume und dort an den Ort der endgültigen Fixierung existieren keine genauen Vorstellungen. Versuche mit radioaktiv markierten Substanzen sprechen für eine Beteiligung von Golgi-Vesikeln (Higuchi 1971).

Im unzerstörten Gewebe (z.B. Horizontalschnitt durch Tracheiden) kann Lignin mit dem UV-Mikroskop nachgewiesen und die enthaltene Menge abgeschätzt werden (Gromov et al. 1977, Fergus et al. 1969, 1970, Sarkanen und Hergert 1971). Die Sekundärwand enthält demnach bei Nadelhölzern 22%, der Bereich Primärwand und Mittellamelle zwischen 6 und 13% Lignin. Der Gehalt kann aber in bestimmten Bereichen (Druckholz, Holzstrahlen) erheblich höher liegen. Bei Laubhölzern ist der Gehalt in der Mittellamelle hoch und wird mit 40% und mehr angegeben. Die verschiedenen Ele-

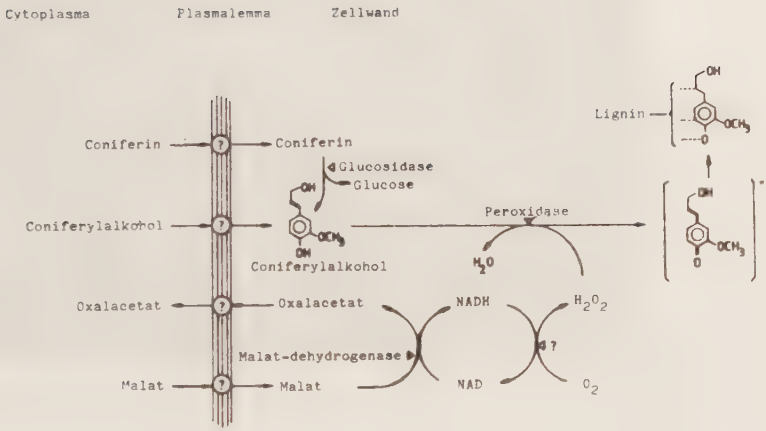


Abb. 2 XI. Derzeitige Vorstellungen über die Bildung des Lignins aus seinen monomeren Bausteinen.

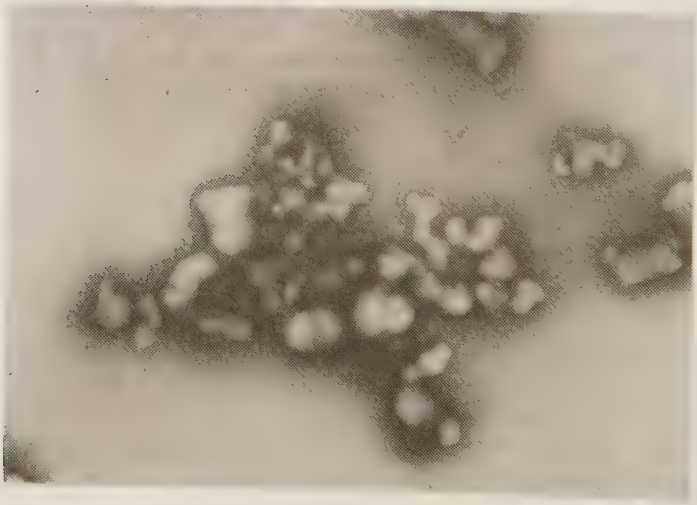


Abb. 2 XIII. Milled Wood Lignin aus Fichte, Vergrößerung etwa 140 000-fach;
(Transmissions-Elektronenmikroskop-Aufnahme von D. Fengel).

mentarbausteine können in unterschiedlichem Verhältnis am Aufbau der einzelnen Wandschichten beteiligt sein (Hardell et al. 1980 a, b, Kolar et al. 1979).

2.4.2 Isolierung und Charakterisierung

In die Modelle konnten auch Untersuchungen an Lignin mit einbezogen werden, das aus biologischem Material gewonnen worden war. Das Problem dabei ist, daß Lignin auf Grund seiner Lage zwischen den Polysacchariden der Zellwand vermutlich nur in Form von mehr oder weniger veränderten Abbauprodukten isoliert werden kann; daher sind verschiedene Erscheinungsformen von Lignin bekannt. Eine Beschreibung des Lignins kann somit kein allgemein gültiges Bild der Struktur liefern, sondern muß sich auf die Darstellung von wichtigen Methoden zu deren Aufklärung beschränken, die bestenfalls Auskunft über Einzelheiten geben.

Ein geringer Teil des Lignins kann bereits mit den Extraktstoffen aus dem Holz gelöst werden. Lignin aus Gräsern ist teilweise in Alkali löslich.

Wird von Extraktstoffen befreites Holz in einer Kugelmühle bis unter eine Teilchengröße von etwa 50 µm gemahlen, so werden die Cellulosefibrillen weitgehend zerbrochen, während das schlagzähere, amorphe Lignin weniger Schaden erleidet (Abb. 2 XII). Es ist dann aber besser zugänglich und kann mit organischen Lösungsmitteln (DMF, DMSO, THF, Dioxan) teilweise gelöst werden; zahlreiche Varianten wurden dafür beschrieben (Glasser und Barnett 1979, Lai und Sarkanen 1971). Die Extraktionszeit läßt sich von einigen Wochen oder Monaten auf 20 Stunden verkürzen, wenn man Ultraschallwellen auf die Probe einwirken läßt (Wegener und Fengel 1977, Wegener und Stoll 1976). Der Rohextrakt kann durch Umfällen weiter gereinigt werden. Das so erhaltene "Lignin aus feingemahlenem Holz" (im allgemeinen mit der englischen Bezeichnung "milled wood lignin", kurz MWL benannt) wird allgemein als das dem Natur-

zustand nächste angesehen und ist Ausgangsmaterial für zahlreiche Untersuchungen.

Die zweite Möglichkeit, Lignin freizusetzen, ist der chemische, meist hydrolytische Abbau der Polysaccharide. Vor allem starke Säuren werden dafür eingesetzt, z.B. Trifluoressigsäure (Wegener und Fengel 1979), 41%ige HCl oder 72%ige H_2SO_4. Auf diese Art kann das Lignin einer Holzprobe vollständig gewonnen werden, folglich haben diese Methoden vor allem eine Bedeutung für die quantitative (gravimetrische) Bestimmung des Lignins in einer Probe (Lai und Sarkanen 1971). Für Strukturuntersuchungen ist das "Säurelignin" nicht geeignet, da es gegenüber dem Naturzustand stark verändert ist: das Grundgerüst und die funktionellen Gruppen bleiben zwar weitgehend unverändert, der Kondensationsgrad und damit die Unzugänglichkeit für chemische Untersuchungen haben sich aber offenbar beträchtlich erhöht (Lai und Sarkanen 1971, Fengel et al. 1981 b).

Auch andere Polysaccharid-lösende oder -abbauende Methoden rufen deutliche Veränderungen am Lignin hervor; sie haben nur für spezielle Probleme Bedeutung, z.B. für histologische Untersuchungen. Erwähnt seien Metallkomplex-Lösungen (Cuoxam, Cadoxen), Periodat-Lösung und Lösungen von Säuren in organischen Lösungsmitteln.

Neben der mechanischen und nicht-katalytischen chemischen Zerstörung der Polysaccharide bietet sich als dritte Möglichkeit ein enzymatischer Abbau an. Es ist bekannt, daß bestimmte Mikroorganismen und Pilze Polysaccharide abbauen ohne das Lignin erkennbar zu schädigen, und auch mit Enzympräparationen läßt sich eine ähnliche Wirkung erzielen (Reese 1977). Obwohl mit solchen Methoden eine größtmögliche Schonung des Lignins zu erwarten wäre, wurden nur wenige Versuche zu einer "enzymatischen Lignin-Isolierung" unternommen. Zunächst wurden nur an dem geringen ethanollöslichen Anteil der Produkte Untersuchungen durchgeführt (Lai und Sarkanen 1971), mit verbesser-

ten Methoden konnten Präparationen erhalten werden, die in Ausbeute und Eigenschaften ähnlich dem MWL sind (Adler 1977, Fišerová und Šutý 1980, Polčin und Bezúch 1977, 1978).

An den isolierten Ligninen können nur wenige Versuche vorgenommen werden, ohne das Material zu zerstören. Hier müssen vor allem spektroskopische Untersuchungen genannt werden, auch wenn diese bei Polymeren meist weniger aussagekräftig sind als bei einfachen Molekülen. So läßt sich z.B. mit Infrarot-Spektroskopie (vergl. Kapitel 3.8) die Anwesenheit von Hydroxyl-, Carbonyl- und Carboxylgruppen im Molekül nachweisen. Die UV-Spektren zeigen charakteristische Absorptionsmaxima vor allem im Bereich um 280 nm, die durch die aromatischen Ringe hervorgerufen werden und für die quantitative Bestimmung verwendet wurden (Goldschmidt 1971). Kernresonanzspektren (^{1}H, ^{13}C) geben vor allem über das Verhältnis von aliphatischen und aromatischen Anteilen im Molekül Auskunft (Brunow und Lundquist 1980, Nimz et al. 1981). Nicht zuletzt durchdiese spektroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Lignin aus biologischem Material im wesentlichen mit dem synthetischen übereinstimmt; allgemein haben sie für den Vergleich verschiedener Lignine große Bedeutung (Adler 1977, Faix 1976, Glasser und Glasser 1976). Die Molekülmassen der isolierten Lignine können nur als Mittelwert bestimmt werden (Goring 1971): die Dichtegradienten-Zentrifugation liefert für MWL Werte von maximal 40 000 (Wegener und Fengel 1977), die Gelpermeations-Chromatographie 80 000 und 30 000 (Sundararajan und Wayman 1970, Wayman und Obiaga 1974), desgleichen Lichtstreuungsversuche (Pla et al. 1977). Es werden jedoch auch Werte um 16 000 angegeben (Adler 1977). Das Elektronenmikroskop zeigt Lignin in Form von globulären, assoziierten Teilchen (Abb. 2 XIII) (Wegener und Fengel 1977, Fengel 1976 c).

2.4.3 Abbau

Einige wichtige Einzelelemente des Ligninmoleküls und deren

Beziehungen untereinander können nur durch Abbaureaktionen und die Untersuchung der Produkte aufgeklärt werden. Die vollständige Verbrennung (Elementaranalyse) gibt das relative Verhältnis von C-, H- und O-Atomen an. Ein höherer O-Anteil wird als Maß für eine oxidative Veränderung angesehen. Die Methoxylgruppe kann nach Abspaltung mit Iodwasserstoffsäure als Methyliodid quantitativ bestimmt werden (Hardell et al. 1980). Aussagen über das Verhältnis von Guaiacyl- zu Syringyl-Resten werden dadurch möglich. Um die Art und Häufigkeit der Verknüpfung zwischen den monomeren Bausteinen genau bestimmen zu können, muß Lignin möglichst vollständig zu Monomeren und Dimeren abgebaut werden. Zahlreiche Methoden wurden dafür beschrieben, z.B. reduktiver Abbau ("Hydrogenolyse") (Hrutfiord 1971, Morohoshi und Glasser 1979, Rouger und Mainguet 1978, Sakakibara 1980), oxidativer Abbau mit Permanganat oder Nitrobenzol (Chang und Allan 1971) oder "schonende Hydrolyse" mit Dioxan/Wasser oder Thioessigsäure (Nimz 1971, Morohoshi und Glasser 1979, Sakakibara 1977); die Ergebnisse stimmen mit denen aus den Modellversuchen überein.

Über den biologischen Abbau durch Pilze und Mikroorganismen ist nicht viel bekannt. Es scheint keine Art zu geben, die in der Lage ist, den Abbau alleine bis zum Endprodukt durchzuführen, vielmehr findet eine Succession von verschiedenen Arten statt, von denen jede eine bestimmte Abbaustufe durchführt. Phenoloxidasen scheinen dabei eine besondere Rolle zu spielen. Ein Abbau findet nicht nur an den Seitengruppen statt, auch der aromatische Kern kann oxidativ gespalten werden (Kirk et al. 1977, Schmidt 1980).

Der Abbau des Lignins hat eine große technische Bedeutung, da er die Voraussetzung für die Gewinnung des wichtigen Rohstoffes Cellulose aus Holz darstellt. Zur Zeit haben zwei Verfahren Bedeutung: der Sulfitprozeß, der die Ligninabbauprodukte durch Sulfonierung wasserlöslich macht, und das Sulfatverfahren bei dem vor allem Ätherspaltungen mit starken Basen entscheiden-

de Veränderungen bewirken. Die Produkte der Zellstoffverfahren können nicht mehr als "Lignine" bezeichnet werden (obwohl dies häufig geschieht), sondern nur noch als Ligninderivate oder Abbauprodukte.

2.5 Lignin-Polysaccharid-Komplexe

2.5.1 Allgemeine Beschreibung

Bei allen Versuchen, Lignin möglichst schonend zu isolieren, ist die gewonnene Substanz mehr oder weniger stark mit Zuckern oder Polysacchariden verunreinigt. Nur stark verändertes Lignin kann zuckerfrei erhalten werden. Umgekehrt sind in Polysaccharid-Präparationen nicht selten Ligninanteile enthalten. In beiden Fällen ist es häufig möglich, durch weitere Fraktionierung die Nebenkomponente soweit anzureichern, daß ihr Anteil den einer bloßen "Verunreinigung" übersteigt. Man spricht dann von "Lignin-Polysaccharid-Komplexen". Der Begriff "Komplex" soll hier keinen Zusammenhang mit der in der Anorganischen Chemie gebräuchlichen Definition der Komplexbindung herstellen, sondern bedeutet lediglich eine stabile Vergesellschaftung von zwei unterschiedlichen Substanzen. Die Existenz dieser Komplexe deutet auf eine sehr enge, möglicherweise kovalente Bindung von Lignin und Polysacchariden hin. Jedenfalls sind diese "Kontaktstellen" ein wichtiges Strukturelement in der übermolekularen Anordnung beider Komponenten. Aus diesem Grund wurden immer wieder Versuche zur Isolierung und Charakterisierung solcher Komplexe unternommen.

2.5.2 Syntheseversuche

Es wird allgemein als sicher angenommen, daß der Aufbau des Polysaccharidgerüsts in der Zellwand bereits abgeschlossen ist, wenn die Lignin-Biosynthese einsetzt. Folglich müßte die Bildung von Lignin-Polysaccharid-Bindungen eine Begleiterscheinung der Lignin-Biosynthese sein. Daher wurden im Zusam-

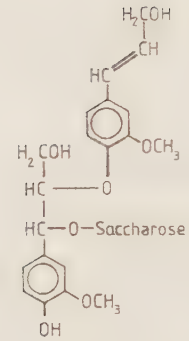


Abb. 2 XIV. Struktur eines an Saccharose gebundenen Dilignols (nach Freudenberg und Harkin, 1960)

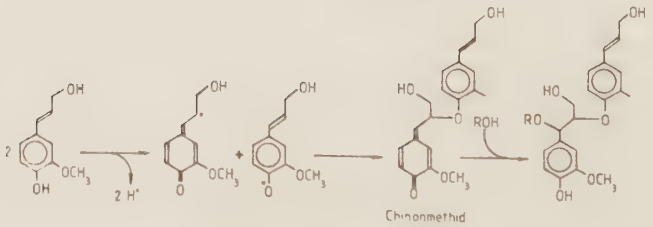


Abb. 2 XV. Reaktion von Chinonmethiden mit Hydroxylverbindungen.

menhang mit Untersuchungen über die Dehydrierungs-Polymerisation von Coniferylalkohol in der Arbeitsgruppe von K. Freudenberg einige Dehydrierungen in gesättigten Saccharoselösungen durchgeführt; unter den Produkten fand sich ein Dilignol, an das Zucker gebunden war (Freudenberg und Grion 1959, Freudenberg und Harkin 1960). Die vorgeschlagene Struktur der Verbindung zeigt die Abb. 2 XIV. Luftsauerstoff in der Gegenwart von größeren Mengen Mangandioxid lieferte als dehydrierendes Agens die besten Ergebnisse; Dimethylformamid diente dabei als Lösungsmittel. Die Reaktion fand aber auch in wäßriger Lösung unter Katalyse eines Enzym-Rohextrakts aus Pilzen statt. Bei beiden Methoden fallen die sehr langen Reaktionszeiten auf (70 - 170 Std.!). Die analoge Mono-Glucose-Verbindung konnte vor kurzem in einer japanischen Arbeitsgruppe dargestellt, isoliert und charakterisiert werden (Katayama et al. 1980 a, b). Die Reaktionsbedingungen waren dabei ähnlich: Coniferylalkohol wurde mit Wasserstoffperoxid und Meerrettich-Peroxidase oder Pilz-Laccase in gesättigter wäßriger Glucoselösung dehydriert. Auch hier wurden bei der Laccase extrem hohe Mengen an Katalysator eingesetzt. Bei allen Versuchen fehlen Angaben über die Ausbeute.

Durch einen Vergleich mit analogen Reaktionen schloß K. Freudenberg, daß die Verbindungen durch Anlagerung von OH-Gruppen an ein instabiles Dilignol, das "Chinonmethid", entstehen (Abb. 2 XV). Die Reaktivität solcher Verbindungen wurde in den letzten Jahren etwas eingehender untersucht (Leary 1980, Leary und Thomas 1975, Nakatsubo et al. 1976, Tanaka et al. 1976, 1979). Dabei wurde sowohl die Reaktion mit Alkoholen wie auch mit Carboxylgruppen beobachtet; Uronsäuren bilden Benzylester, Glucose bildet einen 6-O-Benzyläther. Bemerkenswert ist, daß die Reaktion auch in Wasser oder in wäßriger Lösung abläuft. Wasser ist somit zwar ein konkurrierender Reaktionspartner, verhindert aber die Reaktion mit gelösten Substanzen nicht. Die Kinetik der Reaktion ist offenbar kom-

pliziert und nur Relativwerte über die Reaktivität einiger Alkohole und Säuren liegen vor (Nakatsubo et al. 1976). Neben der Reaktion von Chinonmethiden kann auch die direkte Bildung von p-Hydroxy-Benzyläthern aus den entsprechenden Alkoholen und Hydroxylverbindungen stattfinden (Hemmingson et al. 1978); sie könnte bei der Lignin-Biosynthese wie auch bei Alterungsvorgängen eine Rolle spielen.

Bei der Polymerisation zum Lignin in der Zellwand ist in erster Linie die Möglichkeit einer Reaktion mit den Polysacchariden von Bedeutung. Auch dafür wurden bei in-vitro-Versuchen Anhaltspunkte gefunden. Bereits 1955 berichtet Siegel, daß bei der oxidativen Dehydrierung von Isoeugnol offenbar die Polymerisation bevorzugt an Cellulose oder Methylcellulose stattfindet, wenn diese bei der Reaktion zugegen sind. Daß die Gegenwart von Cellulose die Polymerisationsreaktionen beschleunigt, wurde auch später wieder beobachtet (Evliya und Olcay 1974). Bemerkenswert ist ferner, daß Dehydrierungspolymerisate, die in Gegenwart von Polyosen herstellt wurden, eine etwas höhere Molekülmasse besitzen als Produkte aus analogen, polysaccharidfreien Ansätzen (Higuchi et al. 1971). Außerdem erhöht sich die Erweichungstemperatur von Mannan und Pectin, nicht jedoch von Xylan, wenn in Gegenwart der Polysaccharide eine oxidative Dehydrierung durchgeführt wird (Tanahashi et al. 1981). Die Tatsache, daß selbst isoliertes Lignin mit Polysacchariden scheinbar nicht wieder dissoziierbare Assoziate bildet, weist aber darauf hin, daß nicht unbedingt kovalente Bindungen vorliegen müssen (Harkin und Obst 1973, Yaku et al. 1979). Daß auch unter den Bedingungen einer alkalischen Delignifizierung Lignin-Polysaccharid-Komplexe entstehen können, wurde bei Versuchen mit Zellstoff beobachtet (Kleinert 1965): unter denselben Bedingungen wird Methyl-α-D-Glycosid über das C-6-Atom an Dilignole gebunden (Ohara et al. 1980). Diese Beobachtung zeigt deutlich die Gefahr der Bildung von Artefakten bei Abbaureaktionen.

2.5.3 Lignin-Polysaccharid-Komplexe im Holz

Bereits Björkman (1957) konnte bei seinen wohlbekannten Versuchen zur Extraktion von Lignin aus Holzmehl ("Milled Wood Lignin") eine Fraktion von Lignin-Polysaccharid-Komplexen erhalten, die sich, nach Entfernen des Lignins, mit DMF oder DMSO aus dem Holzmehl extrahieren ließen. Die Ergebnisse konnten später bei ähnlichen Versuchen bestätigt werden (Brownell 1968, 1972, Koshijima et al. 1972). Die auf diese Weise gewonnenen Komplexe waren Ausgangsmaterial für zahlreiche Versuche zur Trennung und Charakterisierung. Eine enzymatische Hydrolyse der Polysaccharide im unveränderten oder teilweise delignifizierten Holz macht die Extraktion von anderen Lignin-Polysaccharid-Komplexen möglich (Bezúch und Polčin 1978, Glasser und Barnett 1979, Mouttet und Robert 1978, Polčin und Bezúch 1977). In den löslichen Lignin-Abbauprodukten, die bei der oxidativen Delignifizierung von Holz entstehen, sind solche Komplexe ebenfalls vorhanden (Glinski und Nichols 1977, Wegener 1976).

Einen Sonderfall bei der Extraktion mit organischen Lösungsmitteln stellen die Versuche einer slovakischen Arbeitsgruppe dar: bei der Acetylierung und Methylierung von Fichten- und Buchenholz wird ein Teil der Polysaccharide so verändert, daß eine Extraktion von Lignin-Polysaccharid-Komplexen direkt, z.B. mit Chloroform, möglich ist (Košiková et al. 1969, 1972). Nach relativ einfachen Reinigungs- und Fraktionierungsschritten (Umfällung und Chromatographie) erhält man ein offenbar einheitliches Material, an dem verschiedene Untersuchungen durchgeführt werden können. Das Lignin-Polysaccharid-Verhältnis in dem Komplex ist etwa 2 : 1.

Schon die Polysaccharide, die mit verdünnten Laugen aus unverändertem Gewebe isoliert werden, können Lignin enthalten (Gordon und Gaillard 1976, Merewether und Samsuzzaman 1972, Morrison 1973). Häufiger werden aber Lignin-Polysaccharid-

Komplexe in Polysacchariden nach der Delignifizierung untersucht. So kann durch enzymatischen Abbau von technischen Zellstoffen Lignin freigesetzt werden, wobei die Lignin-Kohlenhydrat-Bindung von dem Enzym offenbar nicht angegriffen wird (Polcin und Bezuch 1977). Im Gegenteil scheint die Gegenwart von Lignin dessen Wirkung zu behindern. Dies wurde bereits früher bei Versuchen zur enzymatischen Isolierung von Lignin beobachtet (Pew und Weyna 1962). Wasserlösliche Komplexe lassen sich aus Holz extrahieren, das mit einer Lösung von Natrium in flüssigem Ammoniak abgebaut worden ist (Sergeeva et al. 1979 a, b). Bei diesem Abbauverfahren werden sowohl das Lignin wie auch die Polysaccharide teilweise gespalten.

Das nach der Delignifizierung zurückbleibende Lignin läßt sich zusammen mit den Polysacchariden extrahieren, so z.B. mit DMSO aus Holz, das mit Dioxan/HCl teilweise delignifiziert worden war (Mouttet und Robert 1978). Der größte Teil des "Restlignins" aus der Chlorit-Holocellulose von Fichte und Buche geht bei der Extraktion mit KOH in Lösung (Kringstad und Cheng 1969). Der Extrakt läßt sich durch Ionenaustauscher-Chromatographie in mehrere Fraktionen mit unterschiedlichem Lignin-Polysaccharid-Verhältnis trennen (Fengel 1976 b, Fengel und Przyklenk 1976). Die Abbildungen 2 XVI und 2 XVII zeigen die Trennung und die Zusammensetzung der Fraktionen am Beispiel der Fichte. Auch aus der Holocellulose von methyliertem Holz lassen sich Lignin-Polysaccharid-Komplexe extrahieren (Kosiková 1973).

2.5.4 Untersuchungsmethoden und Ergebnisse

Die Chromatographie an DEAE-Ionenaustauschern erwies sich zur Fraktionierung der Komplexe, vor allem nach saueren und neutralen Polysaccharid-Anteilen, als gut geeignet (Yaku et al. 1976, Sergeeva et al. 1979).

Außerdem ist bei Holocellulose-Extrakten eine Trennung in ligninarme und ligninreiche Komponenten möglich (Fengel 1976 b,

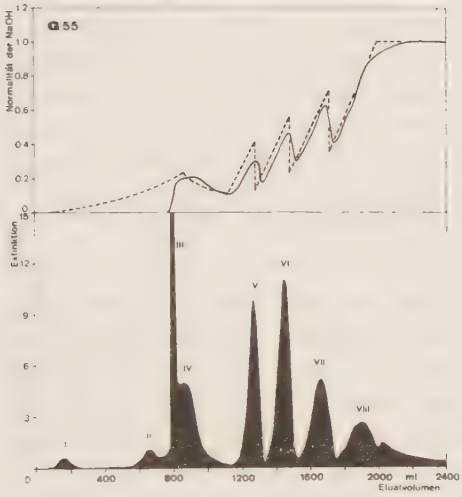


Abb. 2 XVI. Chromatographische Trennung des Alkali-Extraktes aus der Fichten-Holocellulose an DEAE-Sephadex A 25 (nach Fengel 1976 b)

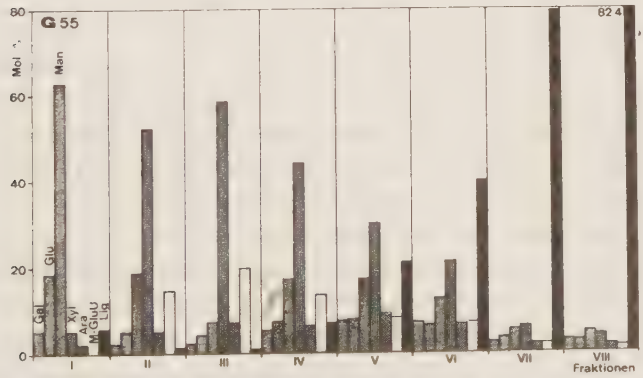


Abb. 2 XVII. Zucker- und Ligningehalt der Fraktionen, die durch Ionenaustauscher-Chromatographie aus dem Alkaliextrakt der Fichten-Holocellulose gewonnen wurden (nach Fengel 1976 b)

Fengel und Przyklenk 1976 b). Als weitere chromatographische Methode wurde häufig die Gelfiltration eingesetzt, vor allem mit Dextran-("Sephadex"-)Gelen (Kringstad und Cheng 1969, Sergeeva et al. 1979, Wegener 1976, Yaku et al. 1976). Da diese Materialien im Idealfall nach der Molekülgröße trennen, ist dabei zusätzlich eine Abschätzung der Molekülmasse möglich. Verwendet wurden, je nach Ausgangsmaterial, verschiedene Geltypen, die Molekülmassen bis maximal 200 000 vermuten lassen. Im Falle von Komplexen in Lignin-Abbauprodukten werden sie mit maximal 3000 angegeben (Wegener 1976). Für andere Präparate lauten die Angaben 8000, mit der Ultrazentrifuge bestimmt (Björkman 1957), sowie 15 000 und 4000 - 5000 bei polysaccharidreichem Material (Koshijima 1972), bestimmt mit Osmometrie bzw. Ebulliometrie. Berichtet wird ferner von Versuchen, Komplexe mit Hilfe der Elektrophorese weiter zu trennen (Fengel 1976 a, Glinski und Nichols 1977, Lindgren 1958, Pivovarova und Bogomolov 1977) oder ihre Einheitlichkeit nachzuweisen (Koshijima et al. 1976). Im elektronenmikroskopischen Bild der Lignin-Polysaccharid-Komplexe sind die charakteristischen Erscheinungsformen ihrer Bestandteile zu erkennen (Fengel 1976, Košiková et al. 1978).

Über die Art der Bindung zwischen Lignin und Polysacchariden sollten vor allem Abbauversuche Auskunft geben. Der enzymatische Abbau der Glycosidbindungen war einerseits ein Mittel, um die Komplexe weiter fraktionieren zu können (Eriksson und Lindgren 1977, Glinski und Nichols 1977, Lundquist et al. 1978, Yaku et al. 1979), andererseits sollte die Stabilität oder Labilität gegenüber einer solchen Hydrolyse Schlüsse auf die Art der Bindung zulassen.

Dabei wird sowohl von einer unvollständigen (Merewether et al. 1972, Polčin und Bezúch 1977) als auch einer offenbar vollständigen Entfernung der Zucker vom Lignin berichtet, was jeweils ein Argument gegen oder für eine glycosidische Bindung

liefert. Die an einigen Präparaten beobachtete Labilität gegen alkalische Behandlung wird auf die Spaltung von Esterbindungen (Košiková et al. 1969, 1977) zurückgeführt, aber auch auf eine sequenzierende Eliminierung der Zucker aus den Polysaccharidketten (Brownell 1971, Košiková et al. 1972), bekannt als "peeling-reaction". Daneben wurden aber auch alkali-stabile Komplexe beschrieben (Brownell 1968, Yaku et al. 1976).

Die am häufigsten angewandte Abbaumethode ist die saure Hydrolyse. Gelingt dabei eine vollständige Entfernung der Zuckerkomponenten, so wird dies als Hinweis auf eine Glycosidbindung bzw. Benzylether- oder Aryletherbindung (Kosiková et al. 1977, Merewether et al. 1972) gewertet. In einigen Fällen gelang der Nachweis eines erhöhten Gehaltes von Phenyl- und Benzyl-OH-Gruppen sowie Carboxylgruppen im Lignin nach der Abspaltung der Zucker (Bezúch und Polčin 1978, Košiková 1977, 1979, Merewether und Samsuzzaman 1972) mit spektroskopischen Methoden oder Farbreaktionen. Überzeugende Beweise über die Vollständigkeit der Abspaltung fehlen bei diesen Versuchen aber, so daß die ebenfalls geäußerte Meinung nicht widerlegt werden kann, bei der saueren Hydrolyse würden nur die Bindungen zwischen den Zuckern gespalten (Brownell 1971). Die aus den Komplexen gewonnenen Zucker sind dieselben, aus denen sichauch die im Holz enthaltenen Polyosen zusammensetzen (Fengel 1976 b, Fengel und Przyklenk 1976), wenngleich auch manchmal in abweichendem Verhältnis (Eriksson und Lindgren 1977, Wegener 1976). In einigen Fällen wurde eine Anreicherung von bestimmten Zuckern (Arabinose, Methylglucoronsäure, Galactose) bei ligninreicheren Komplexen oder Abbauprodukten gefunden (Fengel 1976 b, Kringstad und Cheng 1969, Wegener 1976, Wegener und Fengel 1979). Damit im Einklang steht die Beobachtung, daß diese Zucker bei einer oxidativen Glycolspaltung weniger angegriffen werden (Eriksson et al. 1980). Spektroskopische Methoden wurden, wie schon erwähnt, vor allem

zum Nachweis von funktionellen Gruppen und deren Veränderungen eingesetzt. Mit der Kernresonanz-Spektroskopie läßt sich darüberhinaus das Lignin-Kohlehydrat-Verhältnis ermitteln: so gelang die Beobachtung von Veränderungen im Kohlehydrat-Anteil von Milled Wood Lignin, der unter 2% lag (Lundquist et al. 1980); sie wurden als Hinweis auf eine Benzylester-Bindung gedeutet.

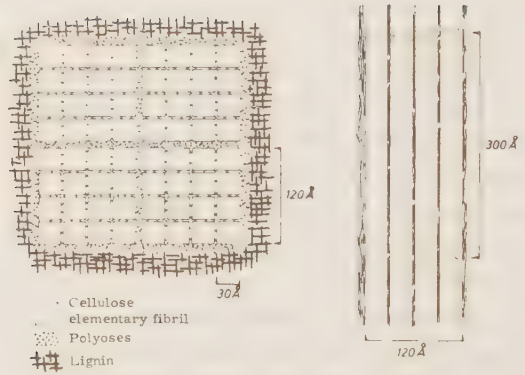
Zusammenfassend muß gesagt werden, daß die vorliegenden Ergebnisse über die Struktur der Lignin-Polysaccharid-Komplexe und insbesondere über die Art der Bindung zwischen den Komponenten keine eindeutigen Aussagen zulassen und sich oft sogar widersprechen. Das könnte mit den unterschiedlichen Ausgangsmaterialien und Aufarbeitungsmethoden erklärt werden; es bleibt jedoch der Verdacht, daß auch unzureichende Methoden und ungeeignetes (z.B. zu uneinheitliches) Material zu Störungen bei den Messungen und falschen Interpretationen der Beobachtungen führten.

2.5.5 Hypothesen zur Lignin-Polysaccharid-Bindung und ihrer Bedeutung im Gefüge der Zellwand

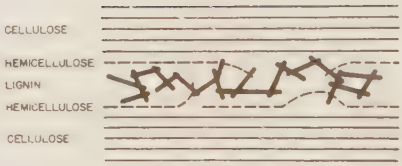
Trotz der im vorangegangenen Abschnitt angedeuteten Probleme wurden häufig Hypothesen über die Art der Lignin-Polysaccharid-Bindung geäußert. Diese behandeln vor allem zwei Gesichtspunkte, nämlich erstens Art und Ort der Bindung am Ligninanteil und zweitens die Frage, welche Zucker an das Lignin gebunden sind. Wie bereits im Abschnitt 2.5.4 beschrieben, gibt es zum letzteren Problem die Vermutung, daß Galactose und Arabinose hier eine wichtige Rolle spielen. Sie könnten über die sterisch besonders günstig gelegene OH-Gruppe am C_6 mit dem Lignin verknüpft sein. Eine solche Art der Bindung würde sterisch auch dadurch begünstigt, daß diese Zucker als Seitengruppen an den Hauptketten der Polyosen gebunden sind. Möglich wäre auch eine Esterbindung über Uronsäure-Seitengruppen, auf die z.B. von einer japanischen Arbeitsgruppe hinge-

wiesen wurde (Yaku et al. 1976). Dagegen könnte die ebenfalls gelegentlich diskutierte glycosidische Bindung nicht über solche Seitengruppen erfolgen. Als Kontaktstelle am Ligninmolekül wird vor allem die Benzyl-OH-Gruppe vermutet (Kosikova et al. 1979, Merewether und Samsuzzaman 1972), eine Hypothese, die durch die in Modellversuchen beobachtete relativ hohe Reaktivität dieser Gruppe (vergl. Kap. 2.2.2) gestützt wird. Daneben wird auch eine Bindung über die phenolische OH-Gruppe erörtert (Košiková et al. 1969).

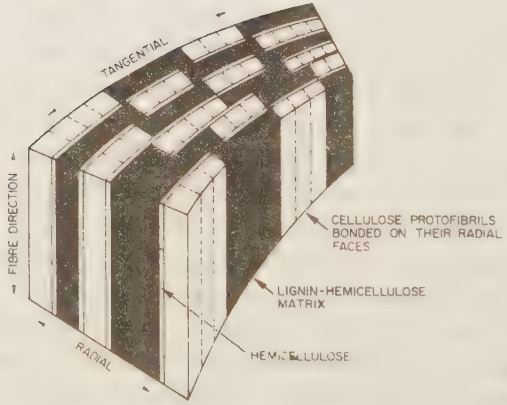
Zwar ist auch eine Bindung zwischen Lignin und Cellulose gelegentlich in Überlegungen mit einbezogen worden (Eriksson et al. 1980, Pew und Weyna 1962), allgemein wird aber in der natürlichen, unveränderten Zellwand vor allem eine Bindung der Polyosen an das Lignin vermutet. Ausgehend von dieser Voraussetzung, von der Beobachtung, daß die Polyosen, ähnlich Cellulose, unter geeigneten Bedingungen ebenfalls zur Bildung von kristallinen und fibrillären Strukturen befähigt sind (vergl. Kap. 2.3), und unter Berücksichtigung von elektronenmikroskopischen Beobachtungen, wurden von mehreren Autoren Modelle entworfen, die Polyosen als Bindeglied zwischen Cellulose und Lignin sehen. Im Modell von Fengel (1970) sind die Cellulosefibrillen in drei Stufen zu regelmäßigen Einheiten geordnet ("Elementar"-, "120 Å"- und "Mikro"-Fibrillen), die von Polyosen durchsetzt sind; diese wiederum sind mit dem Lignin verbunden, das die ganze Anordnung mantelartig umgibt. Die streng regelmäßige Anordnung der Cellulosefibrillen in dem Modell wurde jedoch bereits vom Verfasser selbst in Frage gestellt (Fengel 1978). Kerr und Goring (1975) sehen die Fibrillen zu eher bandartigen Strukturen vereinigt und nehmen an, daß etwa zwei Drittel der Polyosen fest in das umgebende Lignin eingebettet sind. Page (1976) betont die Bedeutung eines solchen Aufbaus für die chemische und mechanische Stabilität der Zellwand. In einem Modell von Albersheim und Mit-



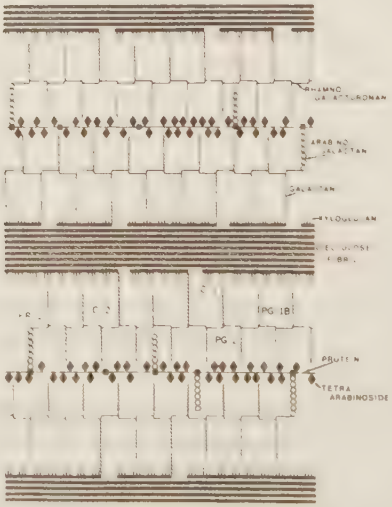
Fengel (1970)



Page (1976)



Kerr u. Goring (1975)



Albersheim et al. (1973)

Abb. 2 XVIII. Graphische Darstellung einiger Hypothesen zur übermolekularen Anordnung der Zellwandbestandteile.

arbeitern (1973) schließlich, das auf Grund von Versuchen zum enzymatischen Abbau von in vitro kultivierten Ahornzellen entworfen worden ist, fällt die geregelte Anordnung der verschiedenen Polyosen auf. An die Stelle des Lignins treten hier Pectine: die Zellen besitzen nur eine Primärwand, die ligninfrei ist. Dagegen soll das Modell von Kerr und Goring die Verhältnisse in der Sekundärwand darstellen, während sich die anderen Arbeiten auf keine besondere Wandschicht beziehen (Abb. 2 XVIII).

2.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

Wie im Abschnitt 2.5 dargestellt wurde, beschränkten sich die Untersuchungen an Lignin-Polysaccharid-Komplexen bisher nur auf den Nachweis und die Bestimmung von einzelnen Strukturelementen. Die Einheitlichkeit des Materials wurde, wenn überhaupt, meist nur mit einer Methode überprüft. Bisher wurden keinerlei Substanzen isoliert, die so beschaffen gewesen wären, daß eine detaillierte Aufklärung ihrer Struktur möglich gewesen wäre. Auf die Gefahren, die mit Strukturuntersuchungen an nicht genau definiertem Material verbunden sind, wurde ebenfalls im vorhergehenden Abschnitt bereits hingewiesen.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche hatten daher den Zweck, die im Alkaliextrakt aus der Holocellulose vorhandenen Lignin-Polysaccharid-Komplexe so weit zu fraktionieren und, falls nötig, abzubauen, bis gereinigte, niedermolekulare Verbindungen erhalten würden, bei denen eine vollständige Aufklärung der Struktur möglich wäre. Eine solche Strukturaufklärung sollte vor allem, wie heute bei den meisten niedermolekularen Naturstoffen üblich, mit spektroskopischen Methoden durchzuführen sein. Die Fraktionierungsmethoden mußten dabei so gewählt werden, daß eine vorhandene kovalente Bindung zwischen Lignin und Zuckern oder Polysacchariden nicht gespalten werden sollte.

Neben der Isolierung von niedermolekularen Lignin-Polysaccharid-Komplexen aus biologischem Material sollte auch versucht

werden, solche synthetisch herzustellen. Dies sollte durch die Durchführung einer katalytischen Dehydrierung von Coniferylalkohol in der Gegenwart von Zucker geschehen. Die Reaktionsbedingungen waren dabei, soweit möglich, den Bedingungen der Biosynthese anzugleichen. Bei diesen Versuchen galt es zu überprüfen, welche Bedeutung den bereits früher von Freudenberg und Mitarbeitern veröffentlichen Ergebnissen beizumessen sei, sowie diese soweit wie möglich zu ergänzen.

Im Zusammenhang mit den bereits vorliegenden Ergebnissen sollten diese Versuche zu einer verbesserten Kenntnis des Baus der Zellwand beitragen, in dem die Bindung zwischen den Hauptkomponenten ein wichtiges Strukturelement darstellt. Eine solche Strukturaufklärung erhält besondere Bedeutung, da sie eine nützliche und möglicherweise notwendige Grundlage für eine technische Nutzung der Holzbestandteile bildet. Während diese bis vor kurzer Zeit auf die Gewinnung von Zellstoff beschränkt war, die mit Hilfe weniger, bewährter Verfahren durchgeführt wurde, versucht man neuerdings auch andere Möglichkeiten und Techniken zu entwickeln (April et al. 1979, Goldstein 1980, Herrick und Hergert 1977, Schurz 1980). Die Trennung von Lignin- und Polysaccharid-Anteilen ist bei allen ein wichtiger Schritt, und eine Erweiterung des Wissens über deren mögliche Verbindung stellt eine wichtige Voraussetzung für weitere Fortschritte auf diesem Gebiet dar.

3. Entwicklung von Arbeitsmethoden: Voraussetzungen, Probleme und Ergebnisse

3.1 Allgemeines

Analytisch-chemische Untersuchungen und Substanztrennungen werden heute meist in Lösung durchgeführt. Die Zellwand besteht, was bei biologischen Materialien selten ist, ihrer Funktion gemäß überwiegend aus unlöslichen Bestandteilen. Um diese zu analysieren, muß daher ein Teil des Gefüges zerstört werden. Dabei ist das Ziel, die Abbaureaktionen so zu führen, daß eine Komponente möglichst unverändert erhalten bleibt, während die anderen entfernt werden. Vollständig gelingt das wohl nie, so daß sich nicht genau sagen läßt, in wie weit die untersuchte Komponente noch dem natürlichen Zustand entspricht, ein Problem, das besonders beim Lignin Bedeutung hat (vergl. Kap. 2.5). Häufig muß selbst die isolierte Substanz verändert werden, um sie in Lösung zu bringen und so untersuchen zu können. Aus diesen Gründen ist es verständlich, daß Zellwandbestandteile nicht zu den bevorzugten Untersuchungsobjekten gehören und nicht für jedes Problem ausgearbeitete Methoden zur Verfügung stehen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellte sich schon bei den ersten Untersuchungen heraus, daß für die Bearbeitung einiger Probleme keine erprobten Methoden vorlagen. Einige Techniken, mit denen in der Arbeitsgruppe schon Erfahrungen gesammelt worden waren, konnten ohne große Änderungen übernommen werden. Die Arbeitsvorschriften sind in Kapitel 7 dargestellt, soweit sie nicht unverändert der Literatur entnommen waren. Noch nicht erprobte Methoden mußten dagegen in der Regel den gegebenen Problemen erst angepaßt oder von mehreren Möglichkeiten die geeignetste ermittelt werden. Da solche Versuche, die Voraussetzungen für die in Kapitel 4 und 5 beschriebenen Ergebnisse waren, einen erheblichen Teil

der experimentellen Arbeit ausmachten, soll auf diese methodischen Entwicklungen und ihre Ergebnisse zuerst etwas näher eingegangen werden.

3.2 Abbau- und Extraktionsmethoden

Für den oxidativen Abbau von Lignin mit Natriumchlorit konnte die in der Arbeitsgruppe ausgearbeitete Methode übernommen werden, sie mußte lediglich für die Verarbeitung von größeren Mengen angepaßt werden. Das Wissen über die Methode (der Mechanismus ist nicht ganz klar) wurde von G. Wegener zusammengefaßt und durch zahlreiche Versuche erweitert (Wegener 1974, 1975a, 1975b, 1976). Auch in neuerer Zeit sind einige Arbeiten über diese Methode erschienen (Strumila und Rapson 1978, Plonka und Surewitz 1979), die als eine der Standard-Methoden zur Delignifizierung bezeichnen werden darf.

Auch für die alkalische Extraktion der Holocellulose stand eine bewährte Methode zur Verfügung (Wise und Ratcliff 1947), die in der Arbeitsgruppe seit längerem verwendet worden war (Wegener 1975b, Fengel 1976a) und nur für größere Ansätze etwas verändert und vereinfacht werden mußte.

Die Totalhydrolyse der Polysaccharide wurde in der Regel mit zwei-normaler Trifluoressigsäure vorgenommen (Fengel und Wegener 1979). Bei den Versuchen zur unvollständigen Hydrolyse wurden zwei Methoden erprobt, nämlich die Hydrolyse in schwach saurer Lösung (pH 3 - 4), wie sie bereits zur Hydrolyse von Milled-Wood-Lignin verwendet worden war (Wegener und Fengel 1979), und eine kurzzeitige Behandlung mit konzentrierter Trifluoressigsäure und anschließendem Verdünnen mit Wasser. Die Ergebnisse sind im Kapitel 5 beschrieben.

Die Extraktion mit n-Butanol aus wäßriger Lösung, wie sie sich vor allem für die Aufarbeitung von Synthesegemischen

bewährt hat, geht auf H. Nimz (Nimz et al. 1974) zurück.

Fällungsmethoden haben sich für die Trennung von Lignin und Polysacchariden sowie für die Anreicherung von einzelnen Komponenten seit langem bewährt (Björkman 1957, Brownell 1971, Wegener und Fengel 1977). Die Methode beruht auf der Tatsache, daß Polysaccharide in der Regel wasserlöslich sind, Lignin aber nicht. Ausgehend von diesen Überlegungen konnte eine einfache Methode entwickelt werden, mit der sich im neutralisierten Alkali-Extrakt aus der Holocellulose ligninreiche und polysaccharidreiche Komponenten voneinander trennen ließen (Abb. 3 I).

3.3 Dünnschicht-Chromatographie

Die Dünnschicht-Chromatographie wurde vor allem zur Prüfung der Einheitlichkeit von Materialien eingesetzt, aber auch als schnelle Möglichkeit für den Vergleich von Materialien verschiedener Herkunft, z.B. aus verschiedenen Dehydrierungsansätzen.

Die Chromatographie wurde ausschließlich auf sogenannten "Nano-DC-Platten" durchgeführt, die sehr schnell Ergebnisse liefern, nur geringe Proben- und Lösungsmittelmengen erfordern und eine bequeme und platzsparende Durchführung der Versuche erlauben. Die Arbeitstechnik ist im Abschnitt 7.3 beschrieben, ebenso wie die Zusammensetzung der drei verwendeten Laufmittel. Das erste, basische Laufmittel wurde in der Arbeitsgruppe bereits seit langem bei einer Methode zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Zuckern eingesetzt (Fengel und Przyklenk 1975): es erwies sich auch für die Untersuchung von niedermolekularen Lignin-Polysaccharidkomplexen als geeignet. Daneben wurde ein zweites, saures und ein drittes, wasserfreies Laufmittel verwendet. Letzteres war eine Variante eines Systems, das von Freudenberg für die Papierchromatographie verwendet worden war.

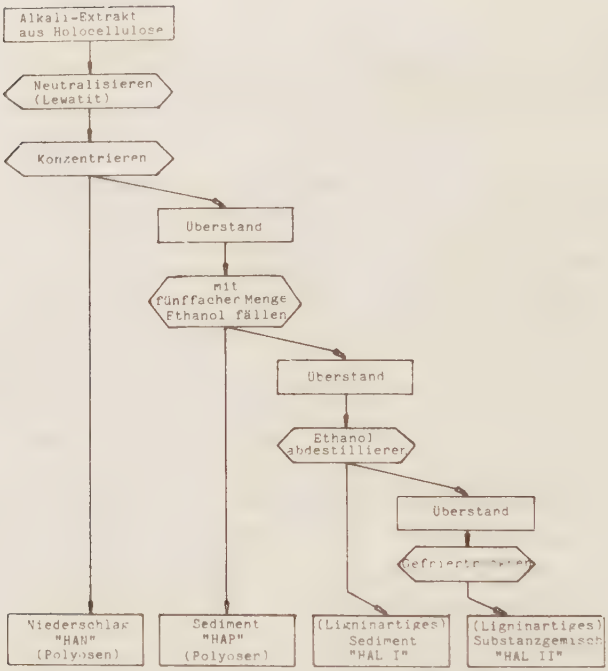


Abb. 3 I. Fraktionierung des Alkali-Extrakts aus der Holocellulose in ligninreiche und polysaccharidreiche Anteile.

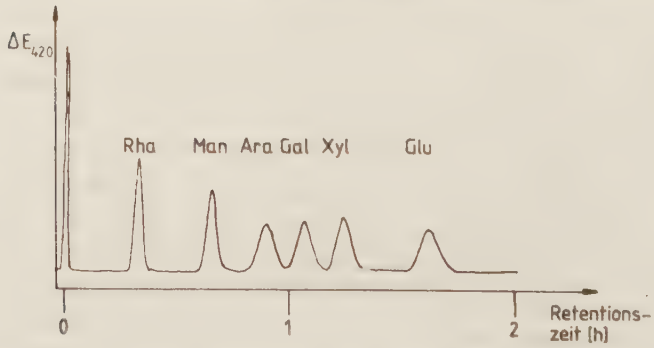


Abb. 3 II. Chromatographische Trennung von Zuckern an einem Ionenaustauscher mit quartären Ammoniumgruppen in Boratpuffer; registriert im Durchfluß-Photometer nach Anfärben mit Orcin-Schwefelsäure.

Es war vor allem für die Untersuchung von niedermolekularen Dehydrierungsprodukten geeignet.

3.4 Chromatographie an Ionenaustauschern

Anionenaustauscher werden schon seit längerem zur chromatographischen Trennung von neutralen und sauren Polysacchariden verwendet. In der Arbeitsgruppe war eine Methode entwickelt worden, durch die der Alkali-Extrakt aus der Holocellulose mit Hilfe eines komplizierten Gradienten fraktioniert werden konnte (Fengel 1976b). Nach der in Kapitel 5 beschriebenen Trennung des Alkali-Extraktes in polysaccharidreiche und ligninreiche Anteile konnte der polysaccharidreiche Anteil mit Hilfe eines einfacheren Gradienten in mehrere Anteile getrennt werden. Als Ionenaustauscher diente dabei DEAE-Sephadex A-25, ein Dextran, an das Diethylaminoethyl-Gruppen (DEAE) als austauschaktive Komponente gebunden sind.

Ein anderer Austauscher mit quartären Ammoniumgruppen und eine Polyacryl-Trägermaterial läßt sich zur Trennung von monomeren und oligomeren Zuckern einsetzen. Die Methode beruht auf der Erscheinung, daß in Borat-Komplexen von Zuckern die pK-Werte der Borsäure durch die verschiedenen Zucker in spezifischer Weise beeinflußt werden und diese somit aus einer Ionenaustauscher-Säule durch Borat-Puffer verschieden schnell eluiert werden. Durch pH-Gradienten läßt sich das Verfahren weiter steuern (Walborg und Lantz 1968, Bauer 1975, Simatupang et al. 1976). Für diese Arbeit stand ein automatisches Gerät zur Verfügung, bei dem das Eluat aus der Säule mit einem Farbreagens (Orcin-Schwefelsäure) vermischt und die Färbung im Durchfluß photometrisch quantitativ bestimmt wurde. Die in den Hydrolysaten üblicherweise vorhandenen Zucker konnten ohne Gradient mit einem 0.4 molaren Puffer vom pH 9.1 getrennt werden (Abb. 3 II). Versuche, die Methode im präparativen Maßstab einzusetzen, um niedermolekulare Lignin-Polysaccharid-Kom-

plexe nach unterschiedlichen Zuckeranteilen zu fraktionieren, gelangen nicht, da die Substanzen vom Säulenmaterial irreversibel festgehalten werden. Auch bei der Fraktionierung des gesamten Alkali-Extraktes an DEAE-Sephadex konnte an der Braunfärbung des oberen Säulenteiles beobachtet werden, daß ein Teil des Materials nicht mehr zu eluieren war. Die Ursache für diese Erscheinung ist unbekannt, sie muß aber jedenfalls in einer Eigenschaft der in den Komplexen enthaltenen Ligninbruchstücke liegen und ließe sich allenfalls nach der Ermittlung von deren Struktur erklären.

Als weiteres System zur Trennung von Zuckern und Oligosacchariden wird die Trennung an Kationenaustauschern mit Wasser als Elutionsmittel beschrieben (Brobst et al. 1973, Scobell et al. 1977). Auch dieses System wurde für zuckerhaltige, niedermolekulare Lignin-Polysaccharid-Komplexe erprobt und führte zu einer reproduzierbaren Trennung. Diese freilich erfolgte nicht auf Grund der Zuckeranteile, sondern offenbar auf Grund einer noch nicht bekannten Eigenschaft der Ligninbruchstücke. Zur Charakterisierung der dabei erhaltenen Fraktionen vergl. Kapitel 5. Da Kationenaustauscher, wie bekannt, auch saure Hydrolysen katalysieren und die Substanzen bis dahin nur unter alkalischen und neutralen Bedingungen behandelt wurden, können auch Abbauvorgänge während der Chromatographie nicht ausgeschlossen werden. Diese müßten aber dann selektiv und reproduzierbar sein.

3.5 Chromatographie an Hydroxylapatit

Hydroxylapatit ($Ca_5(PO_4)_3OH$) ist in der Proteinchemie ein häufig eingesetztes Adsorbens für die Säulenchromatographie (Bernardi 1965), jedoch auch die Fraktionierung von zuckerhaltigem Material ist bereits beschrieben worden (Jenkins 1979). Das Material hat sich insbesondere bei Membranproteinen bewährt, die teilweise hydrophile und hydrophobe Eigenschaften besitzen und sehr zur Assoziation neigen.

Da Lignin-Polysaccharid-Komplexe ähnliche Eigenschaften besitzen, lag es nahe, die Methode auch bei diesen Substanzen zu versuchen. Die Versuche waren erfolgreich, und ein ligninreicher, wasserlöslicher Anteil aus dem Alkaliextrakt der Holocellulose konnte fraktioniert werden, wobei auch die erwünschte Abtrennung zumindest einiger zuckerhaltiger Bestandteile erfolgte. Das Verfahren ist allerdings kompliziert und langwierig. Die Säule muß mit Dimethylformamid äquilibriert werden und nacheinander eluiert mit einem Gradienten DMF-Wasser, mit Wasser, mit einem Gradienten Wasser-Natriumcitrat-Lösung (50 m molar) und schließlich mit 50 m molarer Natriumcitrat-Lösung. Für einen Lauf waren bei der relativ langsamen Durchflußgeschwindigkeit der Säule etwa 6 bis 10 Tage erforderlich, um eine optimale Trennung zu erhalten. Da die Untersuchung der zahlreichen Fraktionen ebenfalls einige Zeit beanspruchte (einige mußten entsalzt werden) und, wie sich herausstellte, die Ausgangsmaterialien nicht immer die gleiche Zusammensetzung hatten (vergl. Kapitel 5), nahmen die Erprobung und Verbesserung einen relativ langen Zeitraum ein, bis schließlich eine reproduzierbare Methode zur Verfügung stand. Eine weitere Optimierung ist aber durchaus vorstellbar. Die technischen Einzelheiten der Methode sind im Kapitel 7 beschrieben.

3.6 Gelfiltrations- oder Gelpermeations-Chromatographie (GPC)

Auf die Bedeutung der Gelfiltrations-Chromatographie für die Untersuchung von Holzbestandteilen wurde bereits im Kapitel 2 hingewiesen. Auch zur Untersuchung von Syntheseprodukten erwies sich die Methode als nützlich (Lundquist und Wesslen 1971, Wayman und Obiaga 1974, Connors 1978).

Die Methode erlaubt im Idealfall, Moleküle, die kleiner als ein bestimmter, vom Säulenmaterial abhängiger Maximalwert ("Ausschlußgrenze") sind, nach ihrer Größe zu trennen. Sie

wurde u.a. von L. Fischer (1980) ausführlich beschrieben. Heute werden zahlreiche Säulenmaterialien ("Gele") verschiedenster Porengröße hergestellt, die jeweils für einen bestimmten Molekulargewichtsbereich geeignet sind. Durch Aufgabe von Eichsubstanzen von bekannter Molekülgröße kann der Trennbereich der Säule ermittelt werden und durch Vergleich der Elutionsvolumina die Molekülgröße von unbekannten Substanzen. Diese ist in der Regel der Molekülmasse proportional. Meistens besteht eine lineare Abhängigkeit zwischem dem Logarithmus der Molekülmasse und dem Elutionsvolumen. Gibt man das Elutionsvolumen in Prozent bezogen auf das Säulenvolumen an, so hat man ein normiertes System, das einen Vergleich zwischen verschieden großen Säulen erlaubt.

Gelegentlich treten neben oder statt der Trennung nach der Molekülgröße auch Adsorptionseffekte auf, die häufig nicht erkennbar sind und die Ergebnisse verfälschen können. Durch die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels oder Puffersystems und Gelmaterials können solche Erscheinungen meistens, aber nicht immer, vermieden werden. Zahlreiche Gelmaterialien sind im Handel: am häufigsten werden Polyacryamid-Gele und Dextran-Gele und deren Derivate verwendet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in etwa 400 Einzelversuchen verschiedene Trennsysteme erprobt und angewandt, wobei die Prüfung auf Einheitlichkeit, die Abschätzung der Molekülmasse und die präparative Trennung von Substanzen das Ziel der Arbeit sein konnten. Die regelmäßig verwendeten Systeme werden im Folgenden kurz beschrieben:

1. Sephadex G mit Ammoniumacetatpuffer

   Die Gele Sephadex G 50 und G 100 (vernetzte Dextrane) wurden für die Untersuchung der Alkali-Extrakte und deren durch Fällung getrennten Bestandteile verwendet, Sephadex G 10 zu einer weiteren Fraktionierung der auf den erstge-

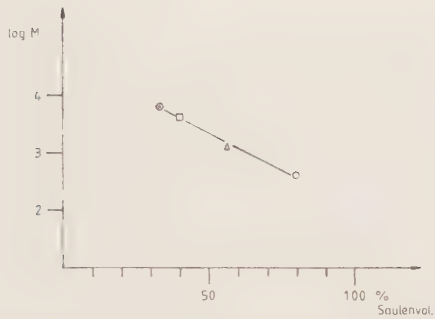


Abb. 3 III. Eichung des Systems Sephadex G-50 / Ammoniumacetatpuffer mit Polyethylenglycolen der Molekülmassen 6000, 4000, 1500 und 400.

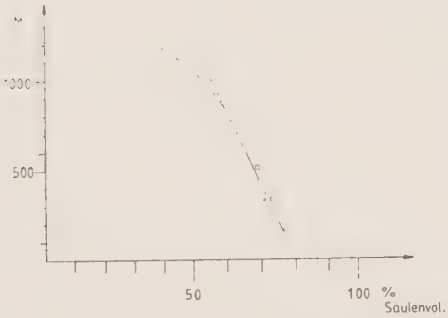


Abb. 3 IV. Eichung des Systems Bio-Gel P 2 / H_2O mit verschiedenen Zuckern (vergl. Tab.3 I).

Tab. 3 I. Molekülmassen der zur Eichung der Bio-Gel P 2 - Säule verwendeten Substanzen.

Substanz	Molekülmasse
Glucose	180
Cellobiose	342
Maltotriose	504
Stachyose	739
Polypropylenglycol	1200

nannten Gelen nicht mehr getrennten niedermolekularen Bestandteile. Auch die Abbauprodukte der polysaccharidreichen Lignin-Polysaccharid-Komplexe wurden in diesem System aufgearbeitet. Die Sephadex G 50-Säule konnte mit Polyethylenglycolen verschiedener Molekülmassen geeicht werden (Abb. 3 III). Das Puffersystem war eine 100 mmolare Ammoniumacetatlösung vom pH 8,5; diesem Puffer wurde gegenüber der Elution mit reinem Wasser der Vorzug gegeben, da durch den alkalischen pH-Wert einer möglichen Spaltung von säurelabilen Bindungen vorgebeugt werden konnte und in Salzlösungen Adsorption am Säulenmaterial seltener vorkommt. Ammoniumacetat zersetzt sich im Vakuum und läßt sich somit aus den Proben nötigenfalls entfernen.

2. Biogel P 2 mit Wasser

Dieses System war ursprünglich nur zum Entsalzen der Fraktionen aus der Apatit-Chromatographie vorgesehen gewesen, erwies sich dann aber auch für analytische Zwecke als geeignet. Anzeichen für Adsorptionseffekte ließen sich nicht feststellen. Biogel P 2 ist ein Polyacrylamid-Gel, dem für diesen Zweck der Vorzug vor den bewährten Dextran-Gelen gegeben werden mußte, wenn die aus der Säule eluierten Substanzen auf ihren Zuckergehalt untersucht werden sollten. Bei der Verwendung von Dextrangelen ließen sich dabei Verfälschungen der Glucosegehalte durch das stets in geringen Mengen mit eluierte Säulenmaterial nicht vermeiden. Eine Eichung des Systems war mit verschiedenen oligomeren Zuckern und einem Polypropylenglycol möglich (Tab. 3 I, Abb. 3 IV). Die Abhängigkeit der Molekülmasse vom Elutionsvolumen ist hier (was ungewöhnlich ist) nicht logarithmisch, sondern eher linear.

3. Sephadex LH mit DMF

Bei einigen in Wasser unlöslichen Substanzen, wie sie insbesondere als Produkte der Dehydrierungsversuche auf-

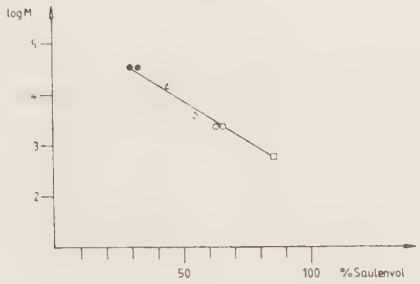


Abb. 3 V. Eichung des Systems Sephadex LH-60/DMF mit Polystyrolen der Molekülmassen 35 000, 15 000, 3 600 u. 2 350 sowie Triton X-100 mit der Molekülmasse 650.

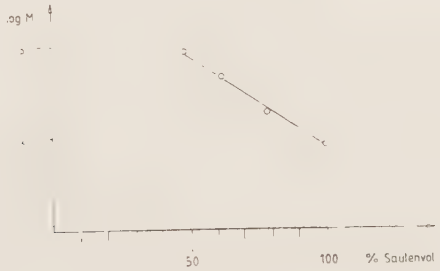


Abb. 3 VI. Eichung des Systems Sephadex LH-20/DMF mit den in der Tab. 3 II angegebenen Substanzen.

Tab. 3 II. Molekülmassen der zur Eichung des Systems Sephadex LH-20/DMF verwendeten Substanzen.

Substanz	Molekülmasse
Sennosid A	863
Quercitrin	482
Coniferylalkohol	180
Pyridin	79

traten, mußte in einem organischen Lösungsmittel gearbeitet werden. Sephadex LH-20 (ein mit Hydroxypropylgruppen substituiertes vernetztes Dextran) brachte, mit Dimethylformamid als Lösungsmittel, die beste Trennleistung und (nach Kirk et al. 1969, Lundquist und Wesslen 1971) die geringste Gefahr einer Adsorption. Für einige Substanzen größerer Molekülmasse war Sephadex LH 60 geeignet. Die Systeme konnten auch als zusätzliche Möglichkeit für die Untersuchung von wasserlöslichen Materialien eingesetzt werden. LH-60 wurde mit käuflichen Polystyrolen geeicht (Abb. 3 V), die für die Eichung von LH 20 (Abb. 3 VI) verwendeten Substanzen sind in der Tabelle 3 II zusammengestellt.

3.7 Lignin-Bestimmung

Die gravimetrische Bestimmung von Lignin als "Säurelignin" nach Runkel (Runkel und Wilke 1951) hat sich bei chemisch unverändertem Lignin gut bewährt. Ihr Prinzip ist eine Totalhydrolyse der Polysaccharide mit 72%iger Schwefelsäure, wobei das Lignin nach dem Verdünnen als unlöslicher Rückstand bleibt. Die Methode macht aber bei stark abgebautem Lignin, wie es z.B. in der Holocellulose und daraus gewonnenen Lignin-Polysaccharid-Komplexen vorliegt, große Schwierigkeiten. Dieses Material ist nach der Hydrolyse in Wasser und verdünnten Säuren, wie sie beim Waschen der Hydrolyserückstände entstehen, merklich löslich, so daß wechselnde Anteile mit ausgewaschen werden und die erhaltenen Werte entsprechend ungenau, schlecht reproduzierbar und möglicherweise irreführend sind. So fällt z.B. bei der Ligninbestimmung in der Holocellulose aus dem Filtrat nach dem Abkühlen ein Niederschlag aus, der eindeutig Lignin enthält, ebenso wie ein Material, das sich mit n-Butanol aus dem Filtrat extrahieren läßt (Spektrum 1,2). Auch in der Literatur findet sich ein Hinweis auf diese Erscheinung (Plonka und Surewitz 1979).

Ähnliches gilt für das "TFE-Lignin", d.h. die Rückstände der Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (Wegener und Fengel 1979). Ein zusätzlicher Nachteil der gravimetrischen Bestimmung ist es, daß sie relativ große Mengen an Proben erfordert und diese dabei zerstört werden. Für wertvolle Substanzen, die z.B. durch langwierige Isolierungsverfahren erhalten wurden, ist sie daher ohnehin ungeeignet.

Somit ist eine Methode erforderlich, mit der Lignin-Abbauprodukte in Lösung und möglichst zerstörungsfrei bestimmt werden können. Da Lignin als aromatische Substanz eine starke Absorption bei Wellenlängen um 280 nm zeigt, bietet sich eine photometrische Messung bei dieser Wellenlänge an (Johnson et al. 1961, van Zyl 1978), da die Absorption im allgemeinen eine Berechnung nach dem Gesetz von Lambert und Beer ($\log A = d \cdot \varepsilon \cdot C$) erlaubt. Dafür wurden auch zahlreiche Versuche beschrieben (vergl. Fengel et al. 1981 a, b). Es zeigte sich aber, daß bei verschiedenartigen Ligninen und vor allem dessen Abbauprodukten die Extinktionskoeffizienten sehr unterschiedlich sind ($\varepsilon = 0{,}8 - 4.2$ $mg^{-1}cm^{-1}$; Wegener 1980) und kein Zusammenhang etwa mit der gravimetrischen Bestimmung besteht (Fengel 1976 b). Zudem können auch Abbauprodukte von Polysacchariden bei 280 nm absorbieren. Die Methode ist also für das häufige Problem, ein Ligninabbauprodukt unbekannter Struktur quantitativ bestimmen zu müssen, ebenfalls nicht geeignet.

Eine Methode, Lignin mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie zu bestimmen, bei der angeblich keine Strukturabhängigkeit bestehen soll (Lundquist et al. 1978), konnte nicht nachgeprüft werden, da die dafür nötige Ausrüstung im Labor nicht zur Verfügung stand. Das gleiche gilt für die Kernresonanz-Spektroskopie, an deren Einsatz für diesen Zweck man auch denken könnte.

3.8 Infrarot-Spektroskopie

3.8.1 Voraussetzungen

Die Schwingungen von Molekülen werden durch Strahlung im Infrarot-Bereich angeregt und verursachen charakteristische Absorptionsbanden im Spektrum, wenn eine Substanz durchstrahlt wird. Die Wellenzahl (d.h. ihre Energie) kann empirisch einer bestimmten Struktur im Molekül zugeordnet werden; die Absorptionsbanden leisten daher wertvolle Dienste für die Strukturuntersuchung einer Substanz. Grundsätzlich kann man zwischen Streck- ("Valenz"-) und Deformationsschwingungen unterscheiden (Abb. 3 VII).

Die Infrarot-Spektren von nicht modifizierten Polysacchariden liefern im allgemeinen wenig Information, da bei diesen Verbindungen nur wenig verschiedenartige Strukturelemente im Molekül vorliegen: neben den Valenzschwingungen der C-H-, O-H-, C-C- und C-O-Bindungen beobachtet man Deformations- und Kombinationsschwingungen, deren Herkunft nicht immer einfach zu erklären ist. Es wurde jedoch gelegentlich versucht, aus Infrarot-Spektren Information über den übermolekularen Aufbau und dessen Veränderungen zu gewinnen (Vodňanský et al. 1963, Zbankov et al. 1975, Ferrus und Pages 1977), insbesondere über die Zugänglichkeit von OH-Gruppen durch H-D-Austausch mit D_2O (Sumi et al. 1963, Taniguchi et al. 1966, Wahba 1977). Saure Polysaccharide können durch die von C=O-Doppelbindungen verursachten Banden zwischen 1600 und 1700 cm^{-1} nachgewiesen werden (Jayme und Tio 1968).

Einige Infrarot-Spektren von Ligninen und Lignin-Derivaten wurden vor kurzem dargestellt (Fengel et al. 1981 b). Charakteristisch für Lignin sind insbesondere die Absorptions-Banden bei 1600 und 1500 cm^{-1} (Valenzschwingungen des aromatischen Rings), zwischen 1470 und 1450 cm^{-1} (CH-Deformationsschwingungen, möglicherweise auch Valenzschwingungen

des aromatischen Rings, meist ein Dublett), und um 1425 cm^{-1} (Kombinationsschwingungen von Carboxylgruppen). Im Spektrum 31 sind zwei Beispiele gezeigt. Zahlreiche andere Banden des Ligninspektrums lassen sich nicht zweifelsfrei zuordnen. Sie wurden unter anderem von Hergert (1971) ausführlich diskutiert.

Die Schwierigkeiten, lösliche Ligninderivate und Abbauprodukte quantitativ zu bestimmen, wurden im Abschnitt 3.7 erörtert. Da sich die quantitative Auswertung von Infrarot-Spektren in der Praxis gut bewährt hat (Weitkamp und Barth 1976), lag es nahe, die Anwendungsmöglichkeit dieser Methode dafür zu untersuchen, obwohl sie weniger empfindlich ist als Messungen im ultravioletten oder sichtbaren Bereich. Versuche zur quantitativen Auswertung der Infrarot-Spektren von Lignin und Modellsubstanzen sind zwar schon mehrmals beschrieben worden (Karklins und Okherina 1975, Sarkanen et al. 1967 a, b, Faix und Schweers 1974), die Substanzen waren dafür jedoch größtenteils in einer KBr-Matrix präpariert worden, einer Technik, die dafür nicht geeignet ist, da sie zu viele nicht oder nur schwer bestimmbare Parameter enthält (Weitkamp und Barth 1976).

Da in der Literatur für Lignin wie für Polysaccharide nur wenige Spektren veröffentlicht waren, mußten zahlreiche Vergleichsspektren aufgenommen werden. Rechnet man die Spektren von Produkten der eigenen Arbeit dazu, so wurden insgesamt 600 Spektren registriert.

3.8.2 Qualitative Interpretation

Bei der Untersuchung von unbekanntem Material, das im Zusammenhang mit Isolierungs- und Synthese-Versuchen erhalten wurde, waren die Infrarot-Spektren eine erste und schnelle Möglichkeit zur Beurteilung der Zusammensetzung. Breite und intensive Absorptionsbanden im Bereich um 1000 bis 1100 cm^{-1}

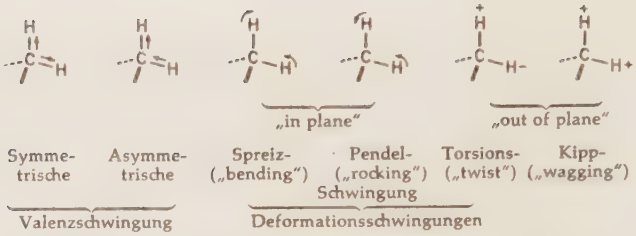


Abb. 3 VII. Einige einfache Typen von Molekülschwingungen mit Bedeutung für die Infrarot-Spektroskopie (Beispiel: Methylengruppe

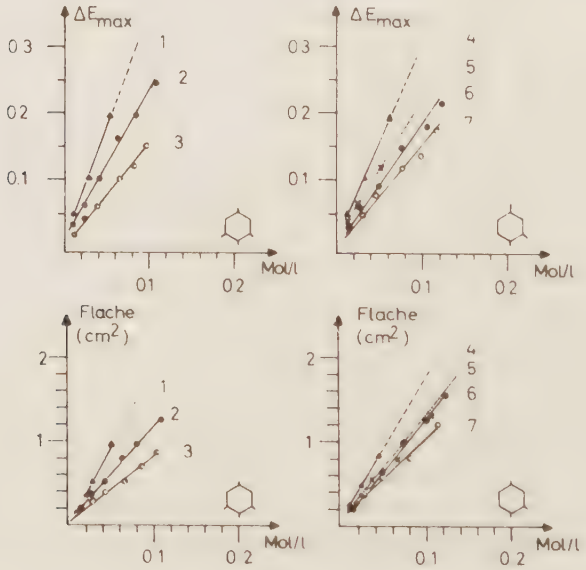


Abb. 3 VII. Konzentrationsabhängigkeit der Fläche und der maximalen Extinktion der Absorptionsbande bei 1500 cm^{-1} bei einigen Lignin-Vergleichssubstanzen; 1. Sinapinsäure; 2. Syringaldehyd; 3. Syringasäure; 4. Ferulasäure; 5. Coniferylalkohol; 6. Vanillin; 7. Vanillinsäure; die Spektren wurden in n-Butanol mit 5% DMSO aufgenommen, die Schichtdicke betrug 0,05 mm.

waren ein Hinweis auf die Gegenwart größerer Mengen von Zuckern oder Polysacchariden, umgekehrt konnte die Abwesenheit solcher Komponenten schnell erkannt werden, wenn die OH-Banden oberhalb 3000 cm^{-1} fehlten. Die Gegenwart von Lignin konnte an den schon erwähnten "Aromatenbanden" um 1600 und 1500 cm^{-1} erkannt werden. Wichtige Hinweise auf die Struktur ließen sich aus den meist sehr intensiven Absorptionsbanden der C=O-Doppelbindungen gewinnen. Diese erscheinen unterhalb 1700 cm^{-1}, wenn sie in Konjugation mit einem aromatischen System stehen, sonst oberhalb. Werden die Banden durch Carboxylgruppen verursacht, verschwinden sie, wenn die Substanz aus alkalischer Lösung präpariert wird. An ihrer Stelle erscheint dann die Absorptionsbande des entsprechenden Carboxylat-Ions bei 1600 cm^{-1}.

3.8.3 Entwicklung einer Methode zur quantitativen Ligninbestimmung

Zur quantitativen Bestimmung von Lignin im Infrarot-Bereich sind vor allem die Banden der C-C-Valenzschwingungen des aromatischen Rings geeignet, die in der Regel zwei deutliche Absorptionsbanden zwischen 1500 und 1520 sowie 1590 und 1610 cm^{-1} hervorrufen. Für einige Substanzen mit einer den Ligninbausteinen ähnlichen Struktur wurden die Konzentrationsabhängigkeit der maximalen Extinktion und der Fläche der erstgenannten Absorptionsbande bestimmt. Sie ist im Bereich von 0,01 - 0,1 molar linear (Abb. 3 VIII). Das gleiche wurde bei Ligninpräparationen festgestellt (Abb. 3 IX). Ferner wurden die Extinktionsmaxima und Extinktionskoeffizienten beider Banden bestimmt und in der Tabelle 3 III zusammengefaßt.

Bei der Durchführung der Versuche und der Betrachtung der Meßergebnisse zeigten sich zwei Probleme: Erstens werden die Absorptionsbanden der Probesubstanzen häufig von der Eigenabsorption des Lösungsmittels gestört, so daß geringe

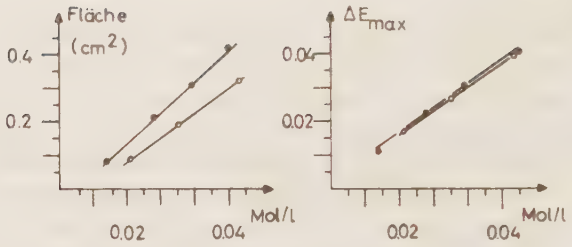


Abb. 3 IX. Fläche und maximale Extinktion der Absorptionsbande bei 1510 cm^{-1} bei zwei Präparationen von Milled Wood Lignin; die molare Konzentration ist für eine $C_{10}H_{12}O_3$-Einheit berechnet; Aufnahmebedingungen wie bei Abb. 3 VIII angegeben.

Tab. 3 III. Extinktionsmaxima und Extinktionskoeffizienten der Aromatenbanden einiger Vergleichssubstanzen für Lignin; die Werte wurden in einer 0.05 molaren Lösung bei einer Schichtdicke von 0.05 mm bestimmt.

Substanz	ν_{max} [cm^{-1}]	$\varepsilon\left[\frac{1}{mol \cdot cm}\right]$	ν_{max} [cm^{-1}]	$\varepsilon\left[\frac{1}{mol \cdot cm}\right]$
Ferulasäure	1603	22,4	1517	59,2
Sinapinsäure	1602	18,8	1518	70,8
Syringasäure	1610	29,6	1517	41,6
Syringaldehyd	1607 1590	26,8 31,6	1513	52,0
Vanillinsäure	1598	27,2	1519	35,2
Vanillin	1596	42,0	1516	42,8
Coniferylalkohol	1597	11,2	1517	52,8
Milled Wood Lignin	1594	4,0	1513	12,0
p-Hydroxy-Benzoesäure	1613 1597	44,0 36,4	1519	16,4
p-Hydroxy-Benzaldehyd	1607 1587	66,0 53,2	1519	14,8

Schichtdicken in der Küvette und hochkonzentrierte Lösungen erforderlich wären, die sich in manchen Fällen nicht herstellen lassen. Insbesondere Messungen in wäßriger Lösung, wie sie bei polysaccharidreichen Präparaten nötig wären, lassen sich kaum durchführen. Zudem werden Küvettenfenster aus NaCl von polaren Lösungsmitteln angegriffen; Fenster aus resistentem Material sind sehr teuer. Zweitens zeigt sich, daß die Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Substanzen sehr unterschiedlich sind, wenn vielleicht auch nicht in solchem Maße wie bei den Absorptionsbanden im UV-Bereich. Der Einfluß von Nachbargruppen auf die Aromatenbanden ist ein bekanntes Phänomen (Katritzky und Topsom 1977); eine Gesetzmäßigkeit läßt sich aus den vorliegenden Meßwerten nicht erkennen, und da die Messungen recht zeitraubend sind, mußte auf die Untersuchung weiterer Substanzen verzichtet werden, die vielleicht zusätzliche Erkenntnisse gebracht hätte.

Das erste Problem konnte durch Einführung einer anderen Aufnahmetechnik umgangen werden, die am Institut für Physikalische Chemie der Universität München entwickelt worden war und sich z.B. für quantitative Untersuchungen an Proteinen und Peptiden gut bewährt hat (Hofmann und Zundel 1971, Zundel et al. 1978). Dabei werden die Proben als gleichmäßiger Film auf einem Trägermaterial präpariert. Die Anordnung ist im Abschnitt 7 beschrieben. Die Abbildung 3 X zeigt am Beispiel eines Buchenlignins, daß auch bei dieser Präparationstechnik eine lineare Abhängigkeit der maximalen Extinktion von der Konzentration vorliegt.

Mehr Schwierigkeiten macht das zweite Problem, die Variationsbreite der Extinktionskoeffizienten. Diese sind in der Regel nicht bekannt, wenn Ligninabbauprodukte von unbekannter Struktur in einer Lösung vorliegen, die darüberhinaus meist mehrere verschiedenartige Chromophore enthalten. Für eine rechne-

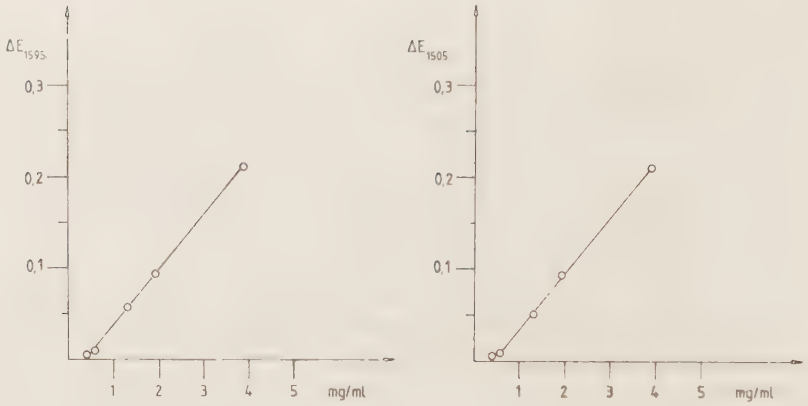


Abb. 3 X. Konzentrationsabhängigkeit der maximalen Extinktion beider Aromatenbanden von Milled Wood Lignin (Buche), präpariert als Film auf Trägermaterial (Germanium); es wurden jeweils 0,5 ml Lösung präpariert.

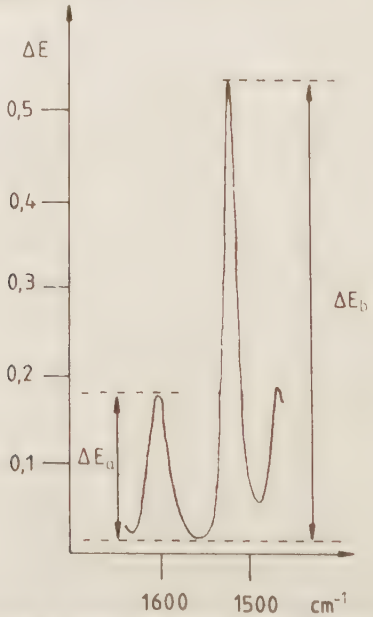


Abb. 3 XI. Quantitative Auswertung der beiden "Aromatenbanden" um 1600 und 1500 cm^{-1} (Beispiel: Coniferylalkohol).

rische Lösung dieses Problems wurde die folgende Methode benutzt: Man denke sich den Ligninanteil einer Probe aus zwei Komponenten zusammengesetzt. Diese besitzen für die Extinktionsbanden bei (a) 1600 und (b) 1500 cm^{-1} die Extinktionskoeffizienten ε_{a1} und ε_{a2} bzw. ε_{b1} und ε_{b2}.

Dann gilt:

$$I' \quad \Delta E_a = \varepsilon_{a1} \cdot c_{a1} + \varepsilon_{a2} \cdot c_{a2}$$

$$II' \quad \Delta E_b = \varepsilon_{b1} \cdot c_{b1} + \varepsilon_{b2} \cdot c_{b2}$$

Da E_a und E_b durch dieselben Substanzen hervorgerufen werden, gilt ferner:

$$III' \quad c_{a1} = c_{b1}$$

$$IV' \quad c_{a2} = c_{b2}$$

wobei ΔE: Extinktionsdifferenz zwischen Vergleichs- und Meßstrahl

c: Konzentration

ε: Extinktionskoeffizient

Zusammengefaßt ergibt das zwei Gleichungen mit zwei Unbekannten:

$$I \quad \Delta E_a = \varepsilon_{a1} \cdot c_1 + \varepsilon_{a2} \cdot c_2$$

$$II \quad \Delta E_b = \varepsilon_{b1} \cdot c_1 + \varepsilon_{b2} \cdot c_2$$

Diese haben die Lösungen:

$$c_1 = \frac{\varepsilon_{b2} \Delta E_a - \varepsilon_{a2} \Delta E_b}{\varepsilon_{a1} \varepsilon_{b2} - \varepsilon_{b1} \varepsilon_{a2}}$$

$$c_2 = \frac{\varepsilon_{a1} \Delta E_b - \varepsilon_{b1} \Delta E_b}{\varepsilon_{a1} \varepsilon_{b2} - \varepsilon_{b1} \varepsilon_{a2}}$$

d.h. für die Gesamtkonzentration der absorbierenden Bestandteile gilt:

$$c = c_1 + c_2 = \frac{\Delta E_a(\varepsilon_{b2} - \varepsilon_{b1}) + \Delta E_b(\varepsilon_{a1} - \varepsilon_{a2})}{\varepsilon_{a1}\varepsilon_{b1} - \varepsilon_{b2}\varepsilon_{a2}}$$

Setzt man nun für die Extinktionskoeffizienten ε_{a1} und ε_{a2} bzw. ε_{b1} und ε_{b2} jeweils die Maximal- und Minimalwerte ein, die bei Vergleichssubstanzen für die betreffende Bande gemessen wurden, so erhält man zwei Konzentrationen c_1 und c_2, die irreal sind, deren Summe $c = c_1 + c_2$ aber die wahre Gesamtkonzentration richtig wiedergibt. Eine derartige Berechnung ist sinnvoll, solange die Probe keinen Chromophor enthält, der die angenommenen Extremwerte überschreitet, d.h. für die realen Extinktionskoeffizienten (ε_{ar}, ε_{br}) aller beteiligten Chromophore muß gelten:

$$\varepsilon_{a1} > \varepsilon_{ar} > \varepsilon_{a2}; \quad \varepsilon_{b1} < \varepsilon_{br} < \varepsilon_{b2}$$

und

$$\frac{\varepsilon_{a1}}{\varepsilon_{b1}} > \frac{\varepsilon_{ar}}{\varepsilon_{br}} > \frac{\varepsilon_{a2}}{\varepsilon_{b2}}$$

Bei einigen Untersuchungen an Lignin und Ligninabbauprodukten und Modellsubstanzen wurde diese Methode eingesetzt (Abb. 3 XI; s.a. Kap. 5). Zu beachten ist dabei, daß dadurch nur der molare Anteil an aromatischen Bestandteilen bestimmt werden kann. Die möglicherweise unterschiedliche Zahl und Größe der Substituenten bei Ligninbruchstücken macht eine genaue Umrechnung, z.B. in Gewichtsprozent, fraglich. Allerdings können dadurch umgekehrt, falls sich die anderen Komponenten einer Probe zweifelsfrei bestimmen lassen, Rückschlüsse auf die Größe der Seitenketten im Lignin gezogen werden.

3.9 Literaturerfassung

Die neu erschienenen Arbeiten wurden, soweit sie in der Bibliothek des Instituts zur Verfügung standen, im Gemeinschaftsarbeit der wissenschaftlichen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe erfaßt und individuell nach Bedarf in einer Kartei registriert. Zur Erfassung der älteren Arbeiten konnte auf die weiter zurückreichenden Karteien von Dr. Wegener und Prof. Dr. Fengel sowie deren Sonderdrucksammlungen zurückgegriffen werden. Darüber hinaus lieferten neuere Übersichtsartikel, die "Chemical Abstracts" und der "Science Citation Index" wertvolle Hinweise. Die Arbeiten wurden in einer Kartei zusammengefaßt, die neben Titel, Verfasser und Literaturstelle auch die Zusammenfassungen des Inhalts enthielten. Jede Arbeit war über ein Autoren- und ein Sachregister zugänglich. Auf diese Art konnten im Laufe der Zeit über 800 Titel erfaßt werden.

Bei den Quellenangaben wurde das Schwergewicht auf Übersichtsartikel und Arbeiten aus neuerer Zeit gelegt. Ältere Arbeiten, die bereits in Übersichtsartikeln zusammengefaßt sind, wurden nur dann gesondert zitiert, wenn sie in unmittelbarem Zusammenhang mit Einzelheiten der vorliegenden Arbeit stehen.

4. Syntheseversuche: Katalytische Dehydrierung von Coniferylalkohol in Gegenwart von Arabinose

4.1 Peroxidase als Katalysator in wäßriger Lösung

4.1.1 Wahl der Versuchsbedingungen

Für die Versuche zur katalytischen Dehydrierung von Coniferylalkohol wurden die von M. Erickson und G. Micksche (1972) angegebenen Versuchsbedingungen gewählt, die eine gezielte Synthese von dimeren und oligomeren Produkten aus zwei Komponenten ermöglichen sollen. Dabei wird in homogener Lösung gearbeitet, als Lösungsmittel dient ein Gemisch aus Wasser und Aceton im Verhältnis 1:4. Die weniger reaktive Komponente wird im Überschuß, zusammen mit dem Enzym, vorgelegt, d.h. in diesem Fall der Zucker. Eine Lösung von Coniferylalkohol im gleichen Medium wird gleichzeitig mit äquivalenten Mengen Wasserstoffperoxid zugetropft. Als Zucker wurde Arabinose gewählt, da bei Untersuchungen an biologischem Material verschiedentlich Hinweise darauf gefunden wurden, daß diese Pentose bevorzugt an Lignin gebunden sein könnte. Der Zucker lag gegenüber der Gesamtmenge an Coniferylalkohol in einem etwa zwanzigfachen molaren Überschuß vor. Die Enzymkonzentration betrug zu Beginn der Reaktion etwa 2,5 mg auf 100 ml Reaktionsmedium.

Bei der Zugabe von Coniferylalkohol und Wasserstoffperoxid zeigte sich eine gelbbraune Färbung im Reaktionsgemisch, die bei Unterbrechung der Zugabe wieder verschwand. Die Zugabegeschwindigkeit wurde so geregelt, daß eine schwache, aber erkennbare Färbung bestehen blieb: es wurden etwa 0,75 mmol Wasserstoffperoxid und Coniferylalkohol pro Stunde zugegeben. Ein geringfügiger Überschuß an Coniferylalkohol gegenüber Wasserstoffperoxid sollte die Entstehung von höhermolekularen Verbindungen erschweren. Nach der Beendigung der Zugabe

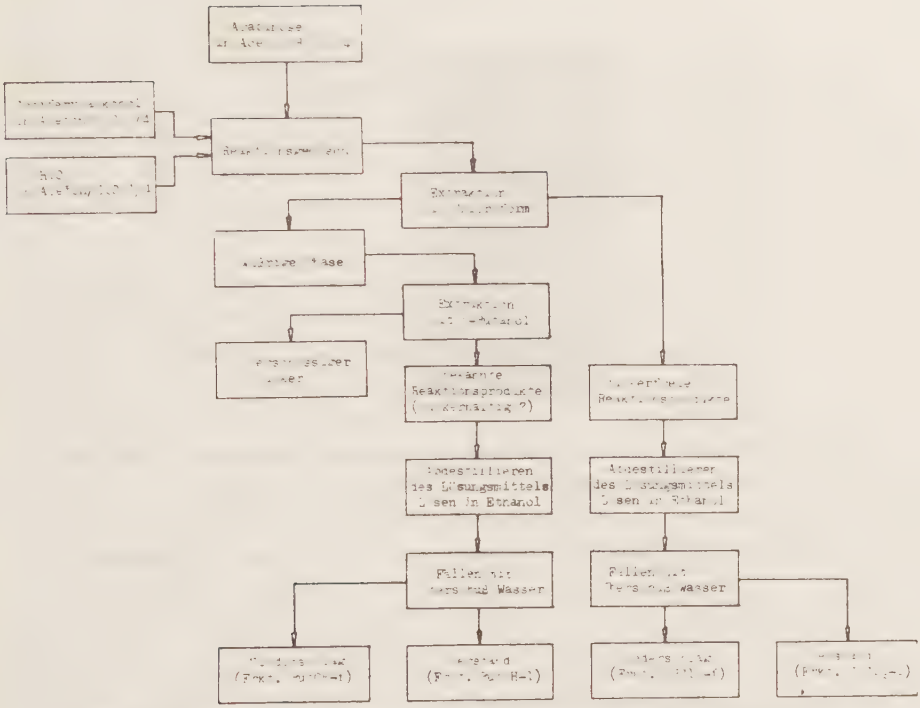


Abb. 4 I. Schematische Darstellung der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches zur Darstellung von Lignin-Polysaccharid-Komplexen.

Tab. 4 I. Ausbeuten der verschiedenen Fraktionen eines Ansatzes zur Dehydrierung von Coniferylalkohol in Gegenwart von Arabinose.

Ausgangsmaterial:	Coniferylakohol	240 mg
	Arabinose	4500 mg
Fraktionen:	N	98 mg
	$CHCl_3$-l	14 mg
	$CHCl_3$-f	31 mg
	ButOH-l	132 mg
	ButOH-f	3 mg

wurde das Reaktionsgemisch 30 Minuten weiter gerührt und dann mit der Aufarbeitung begonnen.

Die Reaktion fand bei Raumtemperatur statt, auf eine Thermostatisierung wurde verzichtet. Um denkbare photochemische Nebenreaktionen auszuschließen, wurde das Reaktionsgefäß abgedunkelt.

Daneben wurden auch noch andere Reaktionsbedingungen untersucht: einmal wurden Arabinose und Coniferylalkohol gemeinsam vorgelegt und Wasserstoffperoxid zugegeben, ein anderes Mal wurde in einem Zweiphasensystem gearbeitet (Methylethylketon/Wasser). Bei beiden Systemen unterschieden sich die Produkte aus zuckerhaltigen Ansätzen nicht erkennbar von denen aus zuckerfreien.

4.1.2 Untersuchung der Produkte

Für die Aufarbeitung hat sich das folgende Verfahren bewährt: Das Reaktionsgemisch wird zunächst dreimal mit Chloroform und dann dreimal mit n-Butanol extrahiert. Falls sich bei der Reaktion oder Extraktion ein Niederschlag bildet, wird er abfiltriert und im Exsikkator getrocknet (Fraktion N). Die zurückbleibende wäßrige Phase wird gefriergetrocknet (Fraktion W). Aus den Extrakten werden die organischen Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in Äthanol gelöst. Bei Zugabe eines Überschusses an Wasser bildet sich ein Niederschlag, der abzentrifugiert und im Exsikkator getrocknet wird (Fraktionen $CHCl_3$-f und ButOH-f). Der Überstand wird anschließend gefriergetrocknet (Fraktionen $CHCl_3$-l und ButOH-l). Ein Schema des Verfahrens zeigt Abb. 4 I. Ein Beispiel für die Mengenverhältnisse ist in der Tabelle 4 I dargestellt. Die für die Fragestellung interessante Fraktion ButOH-l kann an Sephadex LH-60 mit DMF als Elutionsmittel chromatographisch weiter aufgetrennt werden.

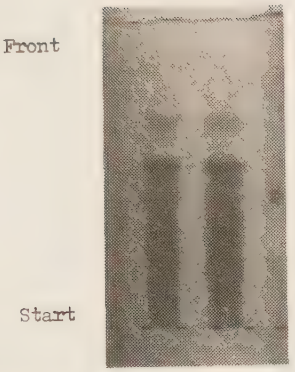


Abb. 4 II. Dünnschichtchromatographische Trennung der mit $CHCl_3$ extrahierbaren Anteile nach der enzymatischen Dehydrierung von Coniferylalkohol; photographiert im UV-Licht bei 254 nm; links aus zuckerfreiem, rechts aus zuckerhaltigem Ansatz. Getrennt mit Laufmittel II.

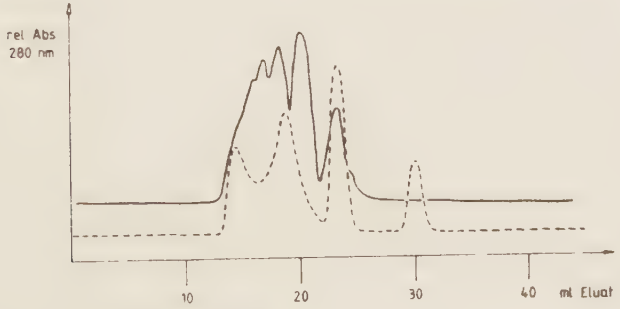


Abb. 4 III. Trennung der mit $CHCl_3$ extrahierbaren Anteile nach der enzymatischen Dehydrierung von Coniferylalkohol an Sephadex LH-20 in DMF; darunter zum Vergleich das Elutionsprofil der in der Tab. 3 II zusammengestellten Eichsubstanzen (gestrichelte Linie).

Die Hauptmenge an Zucker befindet sich in der Fraktion W: diese und die unlösliche Fraktion N (vermutlich Polymere) wurden nicht weiter untersucht. Die Dünnschichtchromatographie zeigt, daß die $CHCl_3$-Fraktionen mindestens aus 7 Komponenten bestehen, und zwar offenbar denselben, wie sie auch in Abwesenheit von Zucker entstehen (Abb. 4 II). Die GPC an Sephadex LH-20 in DMF zeigt, daß die Molekülmassen der Produkte unter 800 liegen, wobei der Anteil der niedermolekularen Substanzen bei zuckerhaltigen Ansätzen gelegentlich etwas geringer ist (Abb. 4 III). Bei allen Ansätzen liegt offensichtlich noch freier Coniferylalkohol vor.

Zuckerhaltige Produkte können nur in der Fraktion ButOH-1 vorhanden sein, einer karamellartigen, hygroskopischen Masse, die sich nur schwierig wiegen läßt. Sie enthält offenbar noch einen größeren Anteil an nicht umgesetztem Zucker. Die Chromatographie an Sephadex LH-20 zeigt, daß der größte Teil der oligomeren Reaktionsprodukte eine Molekülmasse von 800 oder mehr haben muß (Abb. 4 IV). Durch Chromatographie an Sephadex LH-60 kann die Fraktion weiter aufgetrennt werden. Das Elutionsprofil ist dabei nicht immer gleich; meistens erfolgt aber eine Trennung in einen oligomeren und einen polymeren Teil (Abb. 4 V). Ersterer besitzt eine Molekülmasse zwischen 900 und 1200, letzterer zwischen 4000 und 5000. Eine genauere Bestimmung war nicht möglich, da für die fraglichen Bereiche keine geeigneten Eichsubstanzen zur Verfügung standen.

Beim Vergleich der Infrarotspektren der oligomeren Komponenten aus verschiedenen Ansätzen zeigen sich deutliche Unterschiede. Das bedeutet, daß entweder jedesmal ein anderes Produkt oder mehrere Produkte in wechselnden Anteilen vorliegen müssen (Spektrum 3 - 5). Letzteres ist wahrscheinlicher, da auch die Unregelmäßigkeiten in der Aufzeichnung der Absorption bei 280 nm nahelegen, daß mehrere Substanzen vorhanden sind. In einem Fall wurde auch ein Spektrum des höhermoleku-

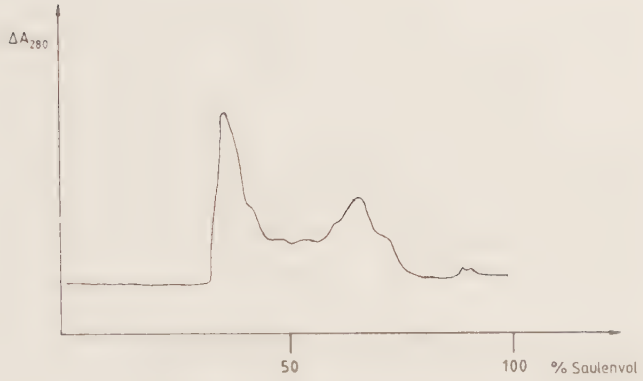


Abb. 4 IV. Chromatographie der Fraktion ButOH-1 an Sephadex LH-20 in DMF.

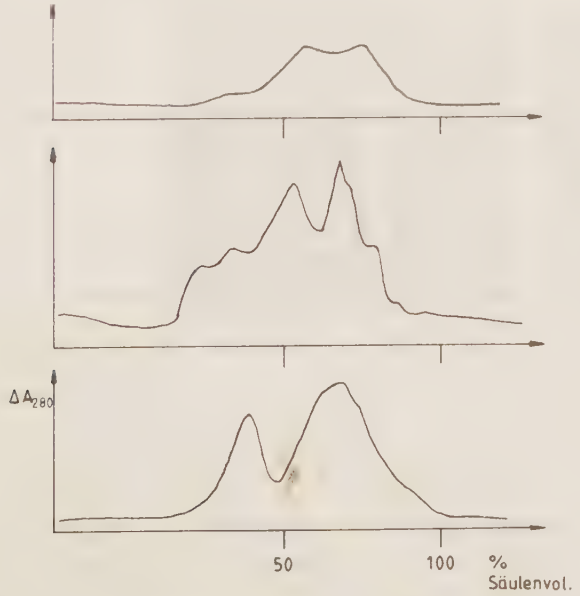


Abb. 4 V. Chromatographie verschiedener Präparationen der Fraktion ButOH-1 an Sephadex LH-60 in DMF.

laren Anteils aufgenommen. Bemerkenswerterweise ist es mit dem des niedermolekularen identisch (Spektrum 6).

Die Infrarotspektren liefern keine eindeutige Aussage darüber, ob in dieser Fraktion Arabinose gebunden ist. Da die Ausbeute gering ist (250 mg Coniferylalkohol liefern nur etwa 3 mg), steht für eine genauere Charakterisierung, etwa durch weitere Fraktionierung, Abbau oder Kernresonanzspektroskopie, nicht genügend Material zur Verfügung.

4.2 Ein Kupfer-Ethylendiamin-Komplex als Katalysator in DMSO-Lösung

4.2.1 Wahl der Versuchsbedingungen

Ziel der Versuche in einem wasserfreien System war es zunächst, eine höhere Ausbeute an zuckerhaltigen Produkten zu erreichen, falls solche bei der Reaktion gebildet würden. Ein völliger Ausschluß von Wasser war nicht möglich, da Wasserstoffperoxid nur in wäßriger Lösung zur Verfügung steht und das zur Herstellung des Katalysators verwendete Kupferacetat Kristallwasser hält.

Da in DMSO eine Denaturierung der Peroxidase zu erwarten war, mußte ein anorganischer Katalysator benutzt werden. Daß Cu^{2+}-Komplexe Peroxidase-Wirkung besitzen, ist bekannt, und dem Ethylendiaminkomplex $(Cu_2en_3)^{4+}$ (Abb. 4 VI) wird die größte Aktivität zugeschrieben (Sigel 1969). Als Gegenion wurde Acetat gewählt, da hierdurch keine nennenswerte Störung der Komplexbildung zu erwarten war. Die Katalysator-Konzentration bei den Versuchen war 10 µ molar, die sonstigen Reaktionsbedingungen waren wie bei dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen System. Da mit geringen Substanzmengen gearbeitet wurde, waren die Absolutkonzentrationen an Coniferylalkohol und Arabinose geringer. Die Zugabegeschwindigkeit betrug nur etwa 0,12 mmol/Std. in Rücksicht auf die geringere

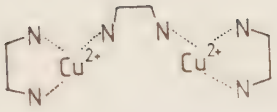


Abb. 4 VI. Vermutliche Struktur des Komplexes $(Cu_2en_3)^{4+}$ (nach Sigel 1969)

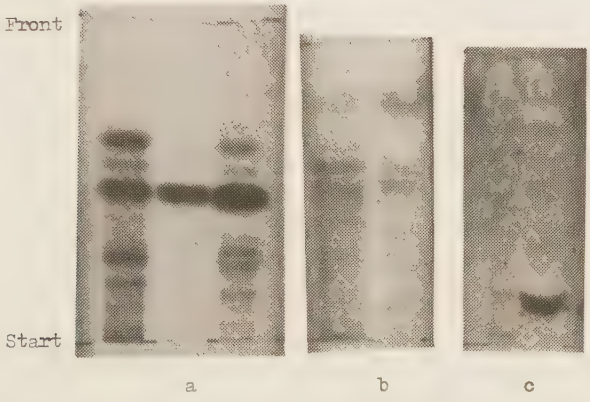


Abb. 4 VII. Dünnschichtchromatische Trennung der Produkte nach der katalytischen Dehydrierung von Coniferylalkohol in DMSO.

a: mit $CHCl_3$ extrahierbarer Anteil aus zuckerfreiem (links) und zuckerhaltigem Ansatz (rechts), dazu Coniferylalkohol (mitte); Laufmittel I.

b u.c: mit n-Butanol extrahierbarer Anteil aus zuckerfereiem (links) und zuckerhaltigem Ansatz (rechts); Laufmittel II.

a u. b: aufgenommen in UV-Licht bei 254 nm

c: aufgenommen im UV-Licht bei 280 nm nach Anfärben mit m-Phenylendiamin.

Aktivität des Katalysators: nach Beendigung der Zugabe wurde 60 min weiter gerührt.

4.2.2 Untersuchung der Produkte

Das Reaktionsgemisch wurde in einen Scheidetrichter mit Chloroform und Wasser gegossen und weiter aufgearbeitet wie beim Ansatz im wäßrigen System (Abb. 4 I). Lediglich auf den letzten Schritt (die Fällung mit Wasser) wurde verzichtet, um schneller einen Überblick über die Reaktionsprodukte gewinnen zu können.

Die Dünnschicht-Chromatographie zeigt, daß noch nicht umgesetzter Coniferylalkohol vorhanden ist. In der $CHCl_3$-Fraktion wie auch in der ButOH-Fraktion sind mehrere Komponenten vorhanden, wobei die letzteren deutlich kleinere Rf-Werte besitzen.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Chromatographie an Sephadex LH-20 in DMF fällt auf, daß auch die mit n-Butanol extrahierten Produkte eine Molekülmasse unter 800 besitzen. Auch beim mit $CHCl_3$ extrahierbaren Anteil scheinen die Produkte etwas anders verteilt zu sein, als das beim Ansatz in wäßriger Lösung der Fall war (Abb. 4 VIII). Nach der Abtrennung der in der Fraktion noch vorhandenen freien Arabinose an Sephadex LH 20 im DMF wurde ein Infrarot-Spektrum des mit n-Butanol extrahierten Produktgemisches aufgenommen (Spektrum 7). Es unterscheidet sich deutlich von den Spektren der oligomeren Produkte aus der entsprechenden Fraktion des wäßrigen Systems, ohne daß sich die Unterschiede einfach interpretieren ließen. Auf den Einbau von Zucker in ein Oligomer läßt sich aus dem Spektrum nicht schließen. Hydrolysiert man die Fraktion aber mit 2 n Trifluoressigsäure, so kann man im Hydrolysat Arabinose nachweisen.

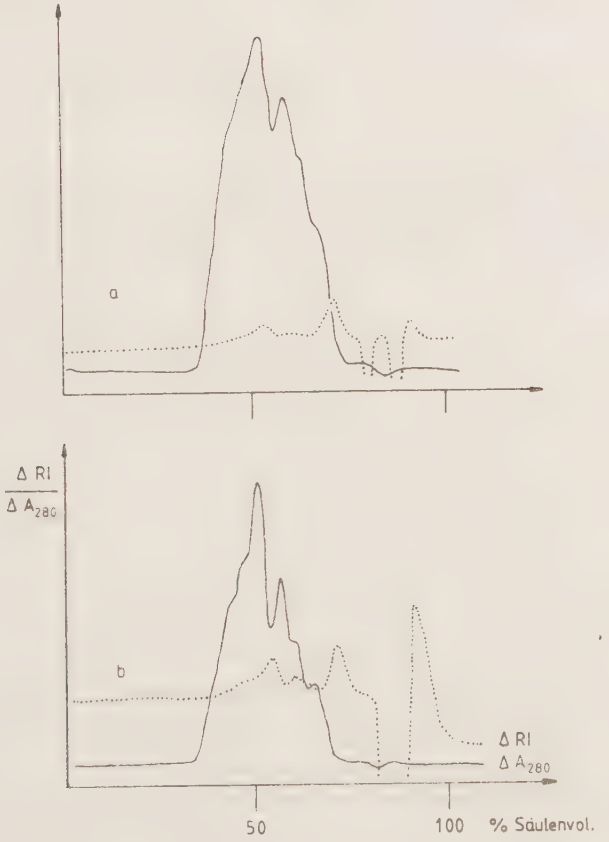


Abb. 4 VIII. Chromatographie des mit $CHCl_3$ (a) und n-Butanol (b) extrahierbaren Anteils nach der katalytischen Dehydrierung von Coniferylalkohol in DMSO an Sephadex LH-20.

5. Versuche zur Fraktionierung des Alkali-Extrakts aus der Holocellulose

5.1 Erste Stufe: Trennung in ligninreiche und polysaccharidreiche Anteile

5.1.1 Entwicklung und Durchführung der Trennung

Die Fraktionierung des Alkali-Extrakts aus der Holocellulose von Fichtenholz an DEAE-Sephadex A 25 führt zu insgesamt 8 Fraktionen unterschiedlicher Zusammensetzung (Fengel 1976 b). Die Gelfiltrationschromatographie der einzelnen Fraktionen an Sephadex G 50 in Ammoniumacetat-Puffer (100 mM, pH 8,5) zeigt, daß die Fraktionen aus einer höhermolekularen und einer niedermolekularen Komponente zusammengesetzt sind (Abb. 5 I zeigt ein Beispiel). Die erste überwiegt in Fraktionen mit hohem Polysaccharidgehalt, die zweite in Fraktionen mit geringem Polysaccharidgehalt. Nach der Hydrolyse bestätigt die Analyse der Zucker im Vergleich mit der UV-Absorption, daß die höhermolekulare Komponente die Hauptmenge der Polysaccharide enthält. Die niedermolekulare muß demnach überwiegend aus Lignin-Abbauprodukten bestehen.

Auch der Gesamtextrakt zeigt bei der Chromatographie an Sephadex G 50 das gleiche Bild (Abb. 5 II), das heißt, der Extrakt muß sich aus polysaccharidreichen und polysaccharidarmen Anteilen zusammensetzen. Es ist somit zweckmäßig, die Fraktionierung des Extrakts mit deren Trennung zu beginnen, insbesondere da bei der Chromatographie des gesamten Extrakts an DEAE-Sephadex A 25 eine bräunliche Substanz nicht wieder aus der Säule eluiert wird und somit verloren geht. Die Gelfiltration zu einer solchen Trennung einzusetzen hätte den Nachteil, daß in einem Arbeitsgang nur geringe Substanzmengen verarbeitet werden können. Zudem müssen nach der Trennung die Puffersalze entfernt werden (die Trennung im salzfreien

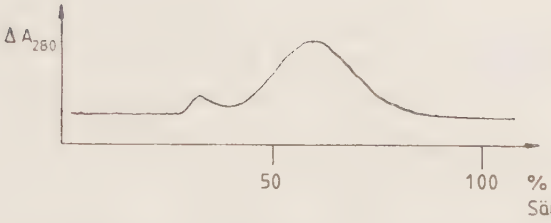


Abb. 5 I. Chromatographie der Fraktion V aus der Anionen-Austauscher-Trennung des Alkali-Extrakts an Sephadex G-50 in Ammoniumacetatpuffer.

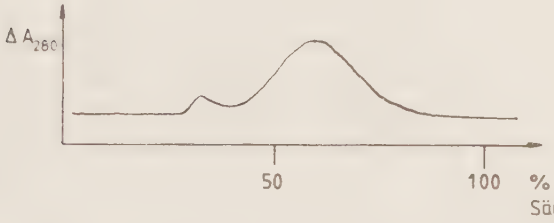


Abb. 5 II. Chromatographie des gesamten Alkaliextrakts an Sephadex G-50 in Ammoniumacetatpuffer.

Tab. 5 I. Ausbeute der Hauptbestandteile des Alkaliextrakts aus der Holocellulose, bezogen auf absolut trockene Holocellulose

	HAN (%)	HAP (%)	HAL I (%)	HAL II (%)
Fichte	-	11,6	1,5	4,8
Buche	6,5	4,8	1,0	3,2

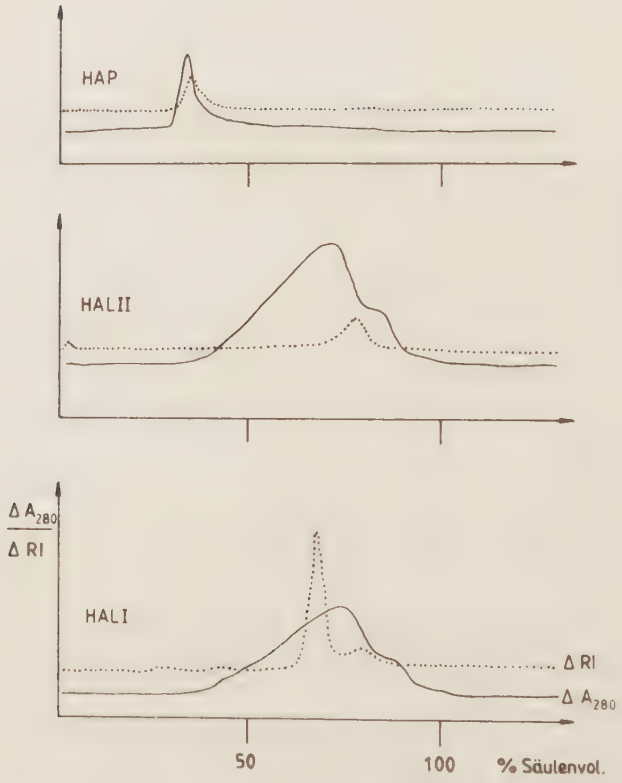


Abb. 5 III. Chromatographie der Hauptbestandteile des Alkali-Extrakts aus der Fichten-Holocellulose an Sephadex G-50 in Ammoniumacetatpuffer.

Medium verläuft nicht genau gleich). Da die ligninartigen Anteile, im Gegensatz zu den polysaccharidreichen, auch in organischen Lösungsmitteln löslich sein sollten, bietet sich die Möglichkeit einer partiellen Fällung an. Eine solche gelingt, wenn man den neutralisierten Extrakt auf etwa 50 ml konzentriert und mit einem fünffachen Überschuß an Ethanol versetzt. Dabei bildet sich ein cremefarbener Niederschlag, der abzentrifugiert werden kann. Er besteht, wie später gezeigt wird, vor allem aus Polyosen und wird daher im folgenden als "HAP" (Holocellulose, Alkaliextrakt, Polyosen) bezeichnet. Destilliert man danach das Ethanol aus der Lösung wieder ab, so fällt erneut ein cremefarbener Niederschlag aus. Der Überstand, eine gelbbraune Lösung, kann gefriergetrocknet werden. Diese beiden Fraktionen enthalten überwiegend ligninartige Anteile und werden mit "HAL I" (Sediment) und "HAL II" (Überstand) bezeichnet (Holocellulose, Alkaliextrakt, Ligninartiges).

Die Chromatographie an Sephadex G 50 zeigt, daß, wie erwartet, die Fraktion HAP den höhermolekularen, die Fraktionen HAL I und HAL II den niedermolekularen Anteil bilden (Abb. 5 III). Die Trennung beim Alkaliextrakt aus der Holocellulose von Buchenholz verläuft analog, jedoch mit dem Unterschied, daß ein Teil der höhermolekularen Komponenten bereits beim Konzentrieren des neutralisierten Extrakts ausfällt und abzentrifugiert werden kann. Er wurde mit "HAN" (Holocellulose, Alkaliextrakt, Niederschlag) bezeichnet (Abb. 5 IV). Der Ablauf der Trennung ist in Abb. 5 V schematisch dargestellt.

Anhand der Infrarot-Spektren konnten die Komponenten bestimmten Substanzgruppen zugeordnet werden. HAP (Spektrum 8) besteht offensichtlich hauptsächlich aus Polyosen mit nur geringen Ligninanteilen. HAL I (Spektrum 9) zeigt die typischen Ligninbanden und ist dem Spektrum des Säure-Lignins aus der Holocellulose (Spektrum 10) ähnlich. HAL II zeigt nur wenige

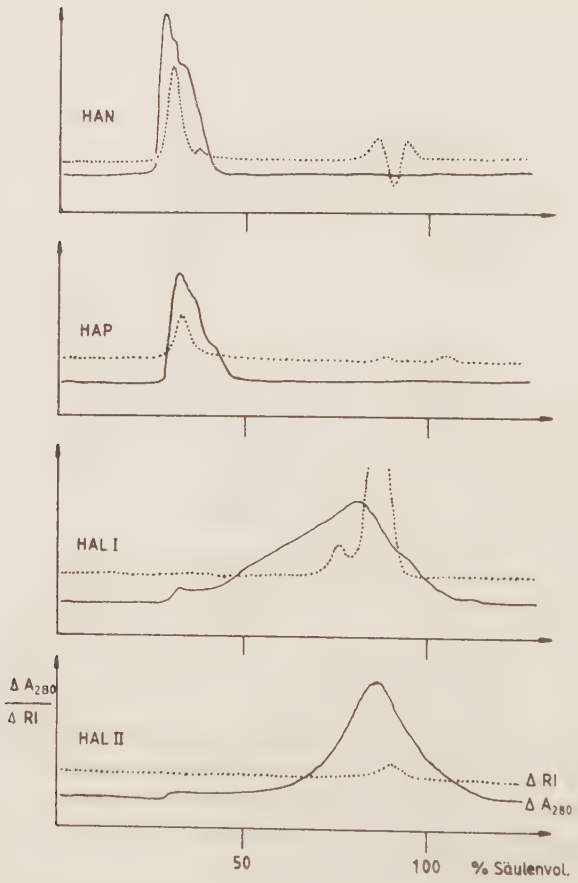


Abb. 5 IV. Chromatographie der Hauptbestandteile des Alkali-Extrakts aus der Buchen-Holocellulose an Sephadex G-50 in Ammoniumacetatpuffer.

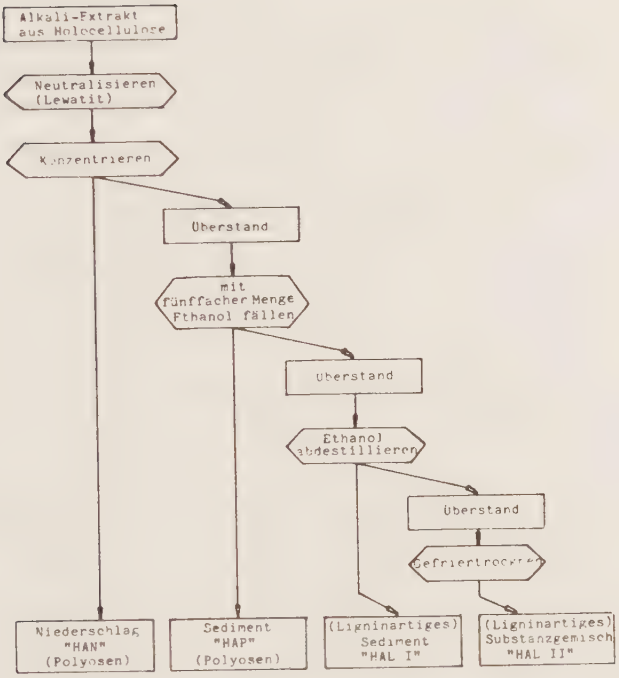


Abb. 5 V. Trennung des Alkali-Extrakts aus der Holocellulose in ligninreiche und polysaccharidreiche Anteile.

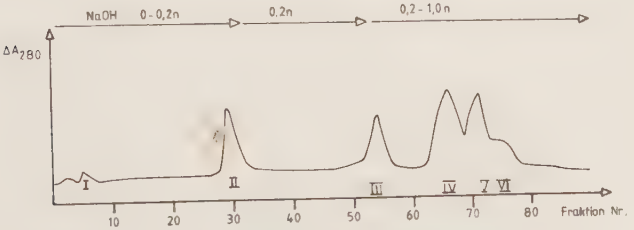


Abb. 5 VI. Optimale Trennung des Anteils HAP aus Fichten-Holocellulose an DEAE-Sephadex A-25.

breite Banden, darunter auch "Aromaten-Banden" um 1500 und 1600 cm^{-1}: die Komponente hat also ebenfalls überwiegend ligninartigen Charakter (Spektrum 12). Den relativen Anteil der Komponenten, bezogen auf die (absolut trockene) Holocellulose zeigt Tabelle 5 I.

Für die weitergehenden Untersuchungen und Fraktionierungen wurde der Alkaliextrakt aus der Fichten-Holocellulose ausgewählt, da mit Präparaten aus Fichtenholz in der Arbeitsgruppe mehr Erfahrungen vorlagen.

5.1.2 Untersuchung des polysaccharidreichen Anteils HAP

Der polysaccharidhaltige Anteil (HAP) besitzt eine Molekülmasse von 6000 oder mehr, wenn man die Eichung der G-50-Säule zugrunde legt, bei der das Material im Ausschlußvolumen eluiert wird. HAP kann an DEAE-Sepnadex A 25 weiter fraktioniert werden. Der dafür nötige Gradient ist einfacher als der für die Fraktionierung des Gesamtextraktes erforderliche Die Trennung führt zu 6 Fraktionen (Abb. 5 VI). Vergleicht man die nach der Hydrolyse ("Intensivmethode") bestimmten Zuckeranteile (relative Werte, bezogen auf gesamten Zuckergehalt, Tab. 5 II) mit den entsprechenden Werten aus der Trennung des Gesamtextrakts (vergl. Kap. 2.5), so findet man eine gute Übereinstimmung. In den Fraktionen III bis VI sind noch geringe Mengen Lignin vorhanden, wie das Auftreten einer Bande bei 1500 cm^{-1} im Infrarot-Spektrum zeigt (Beispiel Spektrum 11). Neben der Totalhydrolyse wurden an einigen Fraktionen (III, V, VI) auch Versuche zu einer partiellen Hydrolyse durchgeführt. Auf Grund von Erfahrungen in der Arbeitsgruppe beim Abbau von Lignin (Wegener und Fengel 1979) wurden zunächst Versuche in schwach saurer Lösung durchgeführt. Eine dreistündige Hydrolyse mit 0,5 n Trifluoressigsäure baut die Polysaccharide bereits zum größten Teil zu monomeren und oligomeren Zuckern ab. Auf Grund dieser Beobachtung wurden Versuche zum Abbau in siedendem Wasser be-

Tab. 5 II. Zuckeranteile (bezogen auf Gesamtzucker) in den durch Anionenaustauscher-Chromatographie getrennten Polyosen (HAP, vergl. Abb. 5 VI), bestimmt nach Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (Intensivmethode).

	Glu %	Xyl %	Gal %	Ara %	Man %	Rha %
Frakt. 10-27	18	5	5	—	71	2
Frakt. 30-37	16	24	6	4	48	3
Frakt. 52-57	5	73	3	8	11	1
Frakt. 63-68	10	51	5	7	27	—
Frakt. 70-77	18	27	11	7	38	—

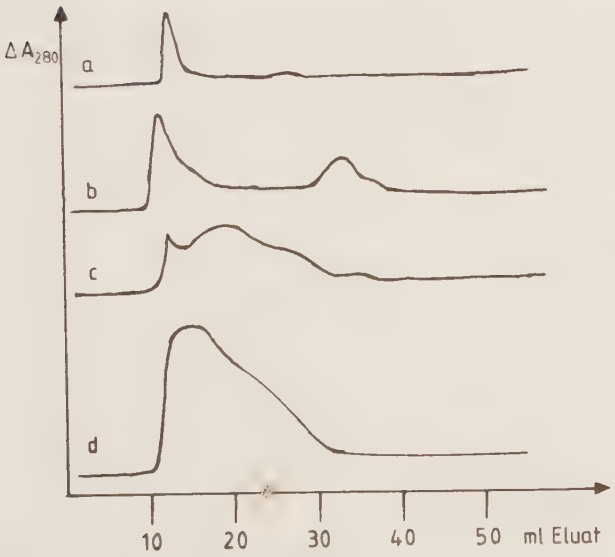


Abb. 5 VII. Trennung der Produkte aus dem Polysaccharid-Abbau in schwach saurer Lösung an Sephadex-Gel in Ammoniumacetatpuffer (Säulen nicht geeicht): a: G-10; b G-50; c: G-100; d: Ausgangsmaterial an G-100.

gonnen, wobei der pH-Wert auf 3 bis 4 gebracht worden war. Nach einer Behandlungsdauer von 3 Stunden wurde die Lösung auf wenige ml eingeengt und gelchromatographisch getrennt (Abb. 5 VII). Auch eine Ethanolfällung entsprechend den Bedingungen bei Alkali-Extrakt wurde durchgeführt. Dabei fällt ein höhermolekulares Material aus, dessen Polymerisationsgrad aber deutlich unterhalb dem des unbehandelten Materials liegt. Die nicht fällbare Substanz enthält im UV absorbierende Komponenten, deren Molekülmasse noch oberhalb 1000 liegen dürfte. Auch monomere Zucker (v.a. Xylose) lassen sich nachweisen.

Eine andere Möglichkeit ist die kurzzeitige Behandlung in einem agressiveren Medium. Die Substanz wurde in 99%iger (handelsüblicher) Trifluoressigsäure 15 Minuten lang zum Sieden erhitzt. Abb. 5 VIII zeigt, daß unter diesen Bedingungen nur noch wenig nicht abgebautes Material zurückbleibt und die intensivste UV-Absorption im niedermolekularen Bereich liegt. Die niedermolekularen Komponenten lassen sich an Sephadex G-10 in mehrere, relativ gut trennbare Anteile fraktionieren. Die Fraktionen ließen sich nicht völlig vom Puffersalz befreien, so daß aus den IR-Spektren keine sinnvollen Aussagen gewonnen werden konnten. Eine qualitative Untersuchung auf Zuckergehalt zeigt, daß die meisten Fraktionen keine freien Zucker, wohl aber Oligomere enthalten: bei einer Nachhydrolyse (2 Std. in 2 n TFE) werden monomere Zucker freigesetzt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß diese Abbaumethode selektiver ist, als der Abbau in schwach saurer Lösung, und daß säurelabile Bindungen (Lignin-Polysaccharid-Bindungen) zum Teil erhalten bleiben.

5.1.3 Untersuchung des ligninartigen Anteils HAL I

Die Komponente HAL I ist eine cremefarbene, auffallend feinpulverige Substanz, die in Alkali, DMF und 96%igem Ethanol löslich, in Wasser und absolutem Ethanol unlöslich ist. Sie zeigt bei der Chromatographie an Sephadex G-50 eine relativ

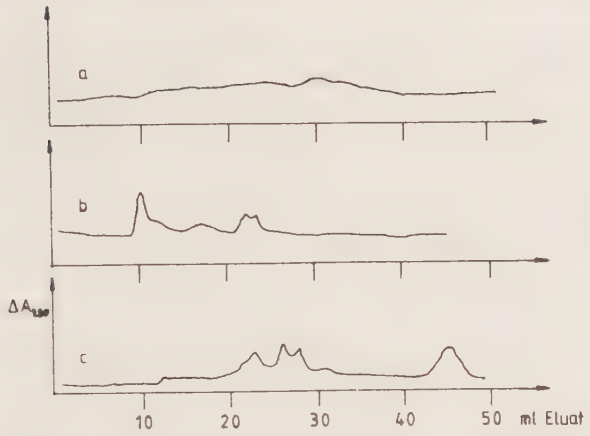


Abb. 5 VIII. Produkte des Polysaccharid-Abbaus in konzentrierter Trifluoressigsäure, chromatographiert an Sephadex-Gel in Ammoniumacetatpuffer (Säulen nicht geeicht); a: gesamte Reaktionsprodukte an G-50; b: niedermolekulare Anteile aus (a) an G-10; c: aus mehreren Läufen (b) ohne den höhermolekularen Anteil vereinigtes Material, rechromatographiert an G-10.

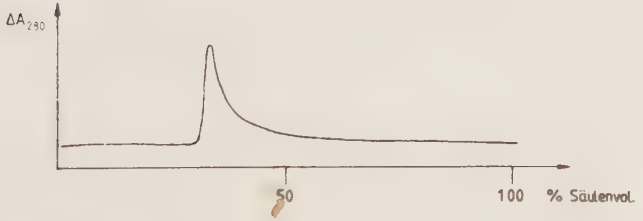


Abb. 5 IX: Chromatographie von HAL I an Sephadex LH-60 in DMF

breite Verteilung, deren Maximum einer Molekülmasse von etwa 1000 entspricht. Bei der Chromatographie an Sephadex LH-60 in DMF erscheint die Substanz im Ausschluß (Abb. 5 IX), sie liegt in diesem Lösungsmittel also offenbar in einem hohen Assoziationsgrad vor. Mit Hilfe des Infrarot-Spektrums konnte sie als ligninartige Substanz identifiziert werden (Spektrum 9). Vergleicht man die Spektren von aus neutraler und alkalischer Lösung präparierten Proben, so erkennt man, daß die sehr intensive C=O-Bande bei etwa 1720 cm^{-1} im zweiten Fall unter 1600 cm^{-1} verschoben ist, was typisch für den Übergang von der Carboxylgruppe zum Carboxylat ist. Das bedeutet, daß die Substanz eine offenbar größere Anzahl an Caroxylgruppen enthalten muß, die nicht mit einem aromatischen System konjugiert sind. Durch die Hydrolyse mit 2 n Trifluoressigsäure werden nur geringe Mengen Zucker freigesetzt (Tab. 5 III). Da die Substanz demnach für Untersuchungen über Lignin-Polysaccharid-Bindungen nur wenig geeignet ist, wurde sie nicht weiter untersucht.

5.1.4 Untersuchung des ligninartigen Anteils HAL II

Die Komponente HAL II fällt beim Eindampfen als braune, harzige Masse, beim Gefriertrocknen als goldgelbes Pulver an. Sie besitzt einen angenehm fruchtigen, an Vanillin erinnernden Geruch und ist frisch präpariert in Wasser, DMF und 96%igem Ethanol löslich, nach längerer Lagerung aber in DMF und Ethanol nur noch teilweise. Nach dem IR-Spektrum (Spektrum 12) zu schließen, enthält sie aromatische Bestandteile und damit Lignin-Abbauprodukte. Die wenigen und breiten Banden des Spektrums lassen auf eine Zusammensetzung aus zahlreichen Substanzen schließen. Dafür spricht auch, daß das Material bei der Chromatographie an Sephadex G-50 eine relativ uneinheitliche Verteilung zeigt: das Maximum entspricht einer Molekülmasse um 1000. Wird der niedermolekulare Anteil abgetrennt, konzentriert und an Sephadex G-10 chromatographiert, so zeigen

Tab. 5 III. Zuckergehalt in einer Probe der Komponente HAL I.

	Glu	MGls	Xyl	Gal	Ara	Man	Rha	sonst.+	zusam.
Gew% Zucker, bez. auf Gesamtsubst.	0,13	0,03	0,16	0,10	0,35	0,20	0,04	0,15	1,2
Gew% Zucker, bez. auf Gesamtzucker	10,8	3,8	13,7	8,5	29,5	16,7	3,7	13.3	100

+Maximalwert an vermutlich unvollständig hydrolysiertem Material

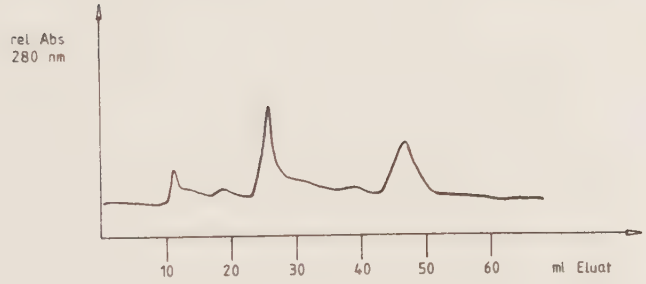


Abb. 5 X. Fraktionierung der niedermolekularen Anteile von HAL II an Sephadex G-10 in Ammoniumacetat-Puffer (Säule nicht geeicht).

sich im Eluat mehrere Fraktionen (Abb. 5 X). Werden diese mit 2 n Trifluoressigsäure hydrolysiert, so lassen sich im Hydrolysat verschiedene Zucker nachweisen.

5.2 Zweite Stufe: Fraktionierung der Komponente HAL II

5.2.1 Chromatographie an Hydroxylapatit

Die Untersuchung der drei Hauptkomponenten des Alkali-Extrakts aus der Fichten-Holocellulose führte zu dem Ergebnis, daß aus der Komponente HAL II am einfachsten niedermolekulare Verbindungen zu isolieren sein müßten, bei denen Zucker und Lignin-Abbauprodukte noch gebunden sind. Aus ihr lassen sich, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben wurde, niedermolekulare Anteile abtrennen, die bei der Hydrolyse Zucker liefern. Zwar können auch die Fraktionen des Anteils HAP zu ähnlichen Substanzen abgebaut werden, hier müßten jedoch zusätzliche Schritte in Kauf genommen werden: zunächst müßte stets die Trennung am DEAE-Ionenaustauscher durchgeführt werden, dann eine reproduzierbare Abbaumethode entwickelt werden und ein Verfahren zur Fraktionierung der (vermutlich zahlreichen) Abbauprodukte. Ferner ließen sich auf Grund des geringen Ligningehalts der Polysaccharide nur sehr kleine Substanzmengen gewinnen. Dem gegenüber erschien es lohnender, eine Abtrennung der zuckerhaltigen Anteile aus HAL II zu versuchen.

Zur chromatographischen Fraktionierung von HAL II erwies sich Hydroxylapatit als geeignet. In längeren Versuchen konnte ein Verfahren entwickelt werden, durch das mit Hilfe eines komplizierten, mehrstufigen Gradienten eine Trennung in 14 Fraktionen möglich war (Abb. 5 XI). Die Fraktionen werden im Folgenden als "LAC 1 - 14" bezeichnet (Ligninreiches aus Alkaliextrakt, Apatit-Chromatographie). Die Trennung dauert etwa 8 Tage und ist noch keineswegs optimal, insbesondere bei den zuletzt mit Na-citrat eluierten Fraktionen, die den Hauptanteil bilden. Die Entwicklung wurde dadurch erschwert, daß

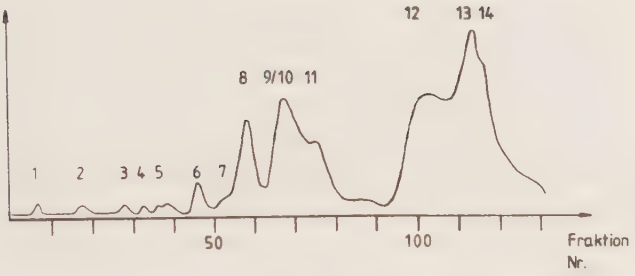


Abb. 5 XI. Chromatographie von HAL II an Hydroxylapatit;
Ausgangsmaterial: Holocellulese aus Großansatz.

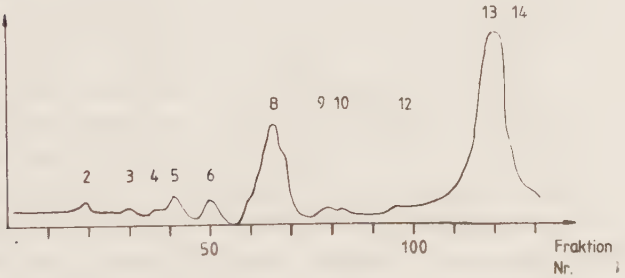


Abb. 5 XII. Chromatographie von HAL II an Hydroxylapatit;
Ausgangsmaterial: Holocellulose aus älterem Vorrat.

Tab. 5 IV. Ungefährer relativer Anteil der Fraktionen der Apatit-Chromatographie, bezogen auf Ausgangsmaterial.

LAC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
%	<1	<1	<1	<1	2	2	3	10		23++	+	26	58	+

\+ die Fraktionen konnten nicht völlig vom Salz befreit werden
++ schlecht getrennt

der Gehalt an den einzelnen Fraktionen bei verschiedenen Ausgangsmaterialien sehr unterschiedlich war, was sich zwangsläufig erst im Laufe der Untersuchungen herausstellen konnte. Die Ursache scheint weniger in der Gewinnung und Aufarbeitung des Alkaliextrakts, sondern vor allem in der unterschiedlichen Qualität der Holocellulosepräparationen zu liegen. Die Abb. 5 XI zeigt die Trennung einer HAL II-Präparation, die aus Holocellulose gewonnen wurde, welche einem "Großansatz" (wie in Kap. 7 beschrieben) entstammte. Deren Gehalt an "Rest Lignin" (bestimmt als Säurelignin nach Runkel) lag bei 2,7%. Dagegen zeigt die Abb. 5 XII die Trennung einer HAL II-Präparation aus Holocellulose, die aus einem älteren Vorrat stammte, welcher mit der zuvor üblichen Arbeitstechnik (Wegener 1974) gewonnen worden war. Der Restliningehalt betrug hier 5,4% (die Werte beziehen sich jeweils auf Trockensubstanz). Die Zuordnung von gleichartigen Fraktionen zwischen solch unterschiedlichen Läufen ist allein durch Vergleich der Elutionsvolumina nicht möglich. Sie muß durch Vergleich der Infrarotspektren erfolgen, ist aber selbst da manchmal fraglich, da die Spektren zum Teil sehr ähnlich sind und bei verschiedenen Ausgangsmaterialien ebenfalls etwas variieren können. Die Bestimmung des genauen Elutionsvolumens wäre zudem sehr aufwendig, da auf Grund des komplizierten Gradienten Durchflußgeschwindigkeit und Fraktionsvolumina nicht konstant gehalten werden können. Aus diesem Grund sind bei der Aufzeichnung der Elutionsprofile nur die Fraktionsnummern angegeben.

Die Tabelle 5 IV gibt die relativen Anteile der einzelnen Fraktionen, bezogen auf das Ausgangsmaterial, wieder. Es wurde ein Beispiel ausgewählt, bei dem alle beobachteten Komponenten vorhanden waren. Die Quantifizierung der Fraktionen ist nicht sehr genau, da einige möglicherweise mit eluiertem Säulenmaterial verunreinigt sind. Die zuletzt eluierten Fraktionen LAC 12 - 14 mußten zudem noch entsalzt werden, was durch Chromatographie an Biogel P 2 in Wasser versucht wurde,

aber nicht immer vollständig gelang. Die Fraktionen wurden nach dem Entsalzen konzentriert, gefriergetrocknet und dann gewogen, ebenso die salzfreien Fraktionen, die kein oder nur wenig DMF enthielten. Die DMF-haltigen Fraktionen wurden vorsichtig bei 10^{-5} bar zur Trockene eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und dann ebenfalls gefriergetrocknet. Bei diesem Verfahren ist es denkbar, daß vor der Wägung Verluste entstanden sind.

5.2.2 Untersuchung der Fraktionen

Die Untersuchung auf Einheitlichkeit und die Abschätzung der Molekülmassen durch Gelfiltration konnte nur bei den Fraktionen durchgeführt werden, von denen größere Substanzmengen zur Verfügung standen. Das Ergebnis zeigt die Abb. 5 XIII. Das für diese Untersuchungen eingesetzte Bio-Gel P 2 mit Wasser als Elutionsmittel lieferte bessere Ergebnisse als das ebenfalls verwendete System Sephadex LH-20 mit DMF. Man sieht, daß die Fraktionen noch aus mehreren Komponenten mit unterschiedlicher Molekülmasse zusammengesetzt sind.

Bei den Infrarot-Spektren (Spektrum 13 - 25) fallen vor allem die intensiven Banden der C=O-Schwingungen auf, die fast ausschließlich von Carboxylgruppen verursacht werden dürften. Werden die Fraktionen ohne Vorbehandlung (von dem bei einigen Fraktionen erforderlichen Entsalzen abgesehen) präpariert, so erscheinen die Banden um 1600 cm^{-1}, d.h. sie liegen unter den basischen Bedingungen der Chromatographie als Carboxylate vor. Erst durch Behandlung mit starken Säuren lassen sich diese wieder in Carboxylgruppen überführen. Mit Ausnahme von LAC 1 sind die Spektren der säurebehandelten Proben abgebildet. Auf diesen sind die Banden der Valenzschwingungen des aromatischen Rings besser zu erkennen, die um 1500 und 1600 cm^{-1} auftreten und zeigen, daß in den Proben größere Anteile an Lignin-Abbauprodukten vorhanden sein müssen. Die erstere ist meistens sehr schwach ausgeprägt. Ob die intensive Absorp-

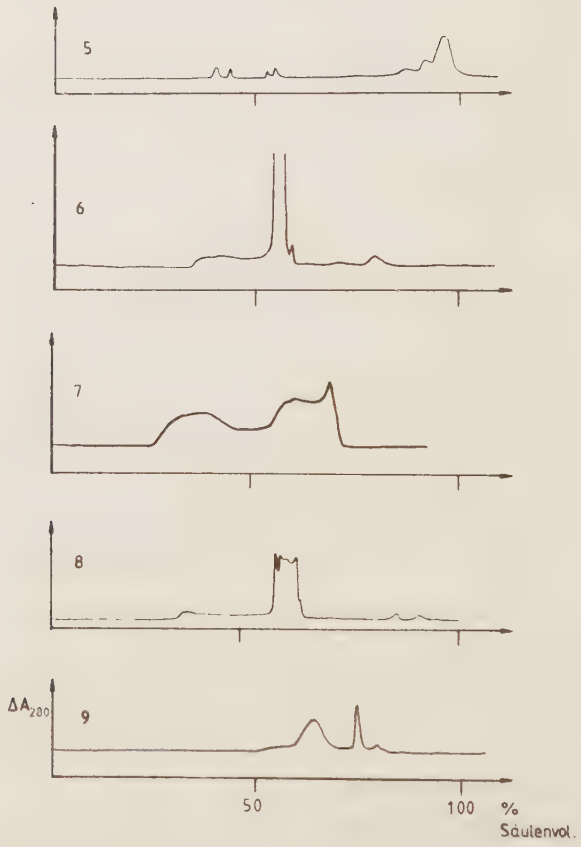


Abb. 5 XIII a Chromatographie einiger Fraktionen aus der Apatit-Chromatographie an Bio-Gel P 2 in H_2O.

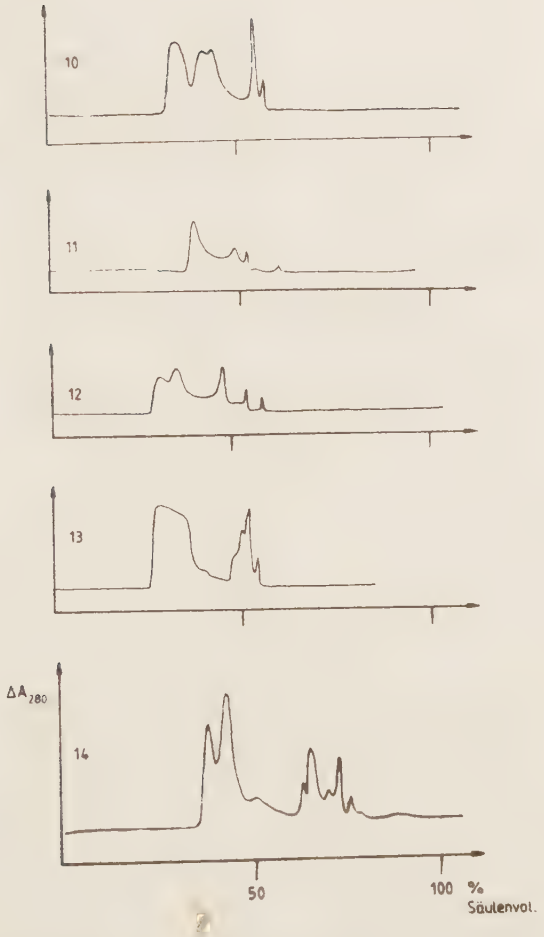


Abb. 5 XIII b Chromatographie einiger Fraktionen aus der Apatit-Chromatographie an Bio-Gel P 2 in H_2O.

tion bei 1600 cm^{-1} nicht auch durch andere Schwingungen mit verursacht wird, z.B. von nicht entfernten Salzen, kann nicht mit Sicherheit entschieden werden. Zu erwähnen ist noch, daß die breite Bande der O-H-Valenzschwingungen oberhalb 3000 cm^{-1} bei einigen Fraktionen sehr schwach ausgeprägt ist und daher die Anwesenheit größerer Zuckermengen ausschließt (LAC 8, 13). Die allgemein meist recht breiten Banden deuten darauf hin, daß die Fraktionen noch aus zahlreichen Komponenten zusammengesetzt sein müssen.

Zur Bestimmung des Gehaltes an aromatischen Bestandteilen (Lignin-Abbauprodukten) muß die Extinktion der beiden "Aromatenbanden" um 1500 und 1600 cm^{-1} bestimmt werden. Dies gelang nur bei einigen Fraktionen. Das Ergebnis der Messung, zusammen mit den Wellenzahlen der maximalen Extinktion, ist in der Tabelle 5 V zusammengestellt.

Der Gehalt an Zuckern wurde durch Untersuchung der Hydrolysate im automatischen Zuckeranalysator bestimmt. Hydrolysiert wurde dazu 1 Std. mit 2 n Trifluoressigsäure. Die Ergebnisse sind zusammen mit den spektroskopisch bestimmten Gehalten an Lignin-Abbauprodukten, in der Tabelle 5 VI zusammengefaßt. Es zeigt sich beim Vergleich zweier Proben, die nahezu identische Elutionsprofile aufwiesen, daß selbst in diesem Fall immer noch erhebliche Unterschiede bei den Zuckergehalten auftreten können, wenn das Ausgangsmaterial aus verschiedenen Holocellulose-Präparationen stammt.

Die Hydrolysate von zwei ausgewählten Fraktionen wurden ebenfalls an Bio-Gel P 2 chromatographiert (Abb. 5 XIV). Dabei zeigt sich, daß sie kein oder nur mehr sehr wenig höhermolekulares Material enthalten, also offenbar auch die zuckerfreien Anteile nach der Hydrolyse nur noch kleine Molekülmassen besitzen.

Es fällt auf, daß einige Fraktionen (LAC 2, LAC 6, LAC 7) ausschließlich oder überwiegend Arabinose enthalten. Diese

Tab. 5 V. Extinktion und Lage des Maximums der Aromaten-Banden einiger Fraktionen aus der Apatit-Chromatographie.

Frakt. LAC	λ_{max} [cm^{-1}]	ΔE [mg^{-1}]
4	1605	0.04
	1505	0,06
5	1605	0,003
	1515	0,006
6	1605	0,009
	1518	0,006
11	1600	0,003
	1512	0,002
12	1600	0,008
	1512	0,007
13	1600	0,006
	1510	0,004

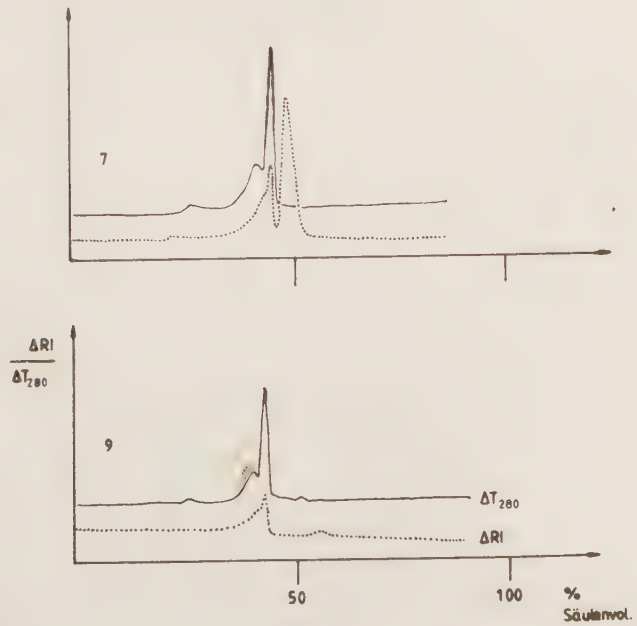


Abb. 5 XIV. Hydrolysate (2n TFE) der Fraktionen LAC 7 u. 9 aus der Apatit-Chromatographie, chromatographiert an Bio-Gel P 2 in H_2O.

Tab. VI. Gehalt an Zuckern und aromatischen Bestandteilen der Fraktionen aus der Apatit-Trennung.

		Glu	Xyl	Gal	Ara	Man	Rha	sonst.	gesamt	aromat.
Probe A	IAC								-	
	-				(9) (0,6)				(9) (0,6)	
	4								-	
	5		sp.		(5) (0,33)		(0,4) (0,025)		(5,4) (0,35)	
	6	0,6 0,044	0,6 0,040	0,5 0,028	4,0 0,270	0,8 0,044	0,3 0,018		7,0 0,444	
	7			0,2 0,013	5,5 0,370	0,1 0,006	0,1 0,006		5,9	
	8									
	9	0,5 0,028	0,4 0,027		0,6 0,040	0,5 0,028	0,1 0,006		2,1 0,395	
	10	0,3 0,017	1,0 0,067	0,1 0,006	0,5 0,033	0,5 0,028	0,2 0,012	+ ++	2,6 0,163	
	11		sp.		sp.	sp.			-	
	12	<0,1	<0,1		0,1 0,006	<0,1	0,2 0,012		0,4 0,018	
	13				<0,1		<0,1			
	14								-	
Probe B Gew. mmol/mg	IAC 1		sp.							
	2				sp.					
	3	0,9 0,050	0,6 0,040						1,5 0,09	
	4		0,8 0,053						0,8 0,053	0,9
	5				sp.					0,5
	6	0,4 0,022	0,2 0,013		0,2 0,013	0,1 0,006	<0,1		1,0 0,053	1,0
	7	0,5 0,028	0,2 0,013		0,5 0,038	0,2 0,011			1,4 0,101	
	8	0,8 0,044	0,1 0,006	0,2 0,011	<0,1	0,5 0,028	<0,1		1,7 0,089	
	9+10 ‡	0,3 0,017	0,4 0,027			0,2 0,011	0,2 0,012		1,0 0,089	
	11	<0,1	<0,1		<0,1	<0,1				
	12	0,3 0,017	0,8 0,053	<0,1 0,006	0,4 0,027	0,1 0,006	0,1	+ ++	1,7 0,109	0,4 1,0
	13	0,4 0,022	0,2 0,013	0,2 0,011	0,7 0,044	0,2 0,011	<0,1		1,8 0,101	0,7
	14						0,1	++		

	Glu	Xyl	Gal	Ara	Man	Rha	sonst.	gesamt	aromat.

+ 4-O-Methyl-Glucuronsäure; ++ Desoxyzucker; ‡ Fraktionen schlecht getrennt

ist allerdings merkwürdigerweise bereits in der nicht hydrolysierten Probe nachweisbar, sie muß also offenbar teilweise während der Lagerung im DMF-Wasser-Gemisch abgespalten werden. In der Fraktion LAC 12 ist ein relativ hoher Anteil von zwei unbekannten Zuckern enthalten, die sonst nur selten und in geringen Mengen in Hydrolysaten aus Polyosen beobachtet wurden (Abb. 5 XV). Der Retentionszeit nach könnte es sich um Rhamnose und einen weiteren Desoxyzucker handeln, oder aber um schwer hydrolysierbare Dimere oder Oligomere. Die eine Substanz wurde voräufig als Rhamnose quantitativ bestimmt (zur Identifizierung der Desoxyhexosen vergl. Wagner et al. 1980).

5.3 Dritte Stufe: Fraktionierungsversuche an einigen LAC-Fraktionen

5.3.1 Präparative Gelfiltrations-Chromatographie

Die im analytischen Maßstab oder zum Zwecke des Entsalzens durchgeführten chromatographischen Trennungen zeigten, daß die untersuchten Fraktionen noch aus mehreren, möglicherweise zahlreichen verschiedenen Bestandteilen zusammengesetzt sind. Es lag nahe, die Trennung in einem etwas größeren Maßstab durchzuführen und die einzelnen Komponenten etwas genauer zu untersuchen. Es wurde die Fraktion LAC 6 ausgewählt, da diese vor allem Arabinose und daneben nur noch wenig andere Zucker enthielt. Das Elutionsprofil der Chromatographie an Bio-Gel P 2 in Wasser ist in der Abb. 5 XVI noch einmal wiedergegeben. Die Dünnschicht-Chromatographie (Abb. 5 XVII) zeigt, daß auch das scharfe Maximum, das einer Molekülmasse um 800 entspricht, noch aus mehreren Komponenten besteht. Dagegen scheint das kleinere Maximum mit einer geringfügig kleineren Molekülmasse einheitlich zu sein.

Aus den Infrarot-Spektren ist zu erkennen, daß diese beiden Komponenten offenbar keine Zucker mehr enthalten, denn die Absorptionsbanden sind im Bereich um 100 - 1200 cm^{-1} schwach und relativ scharf (Spektrum 26, 27). Dagegen zeigt das Spek-

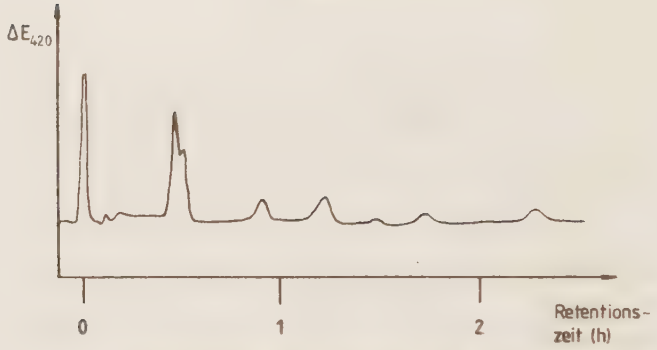


Abb. 5 XV. Chromatographische Trennung des Hydrolysats der Fraktion LAC 12 im automatischen Zuckeranalysator.

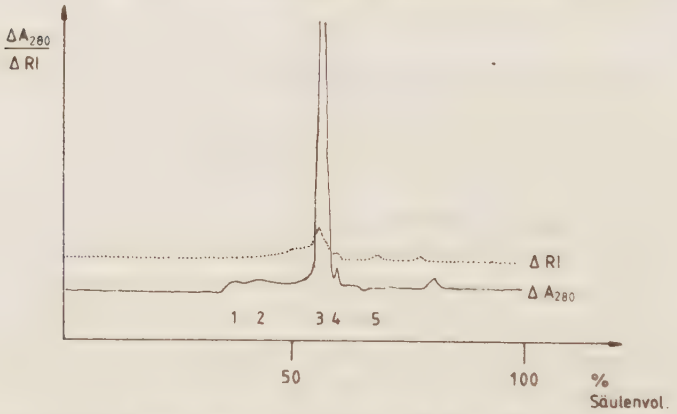


Abb. 5 XVI. Chromatographie der Fraktion LAC 6 an Bio-Gel P 2 in H_2O

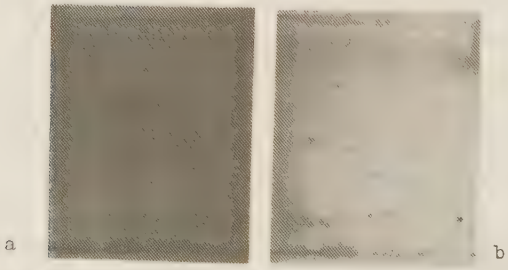


Abb. 5. XVII. Dünnschicht-Chromatographie der Fraktionen aus der Trennung von LAC 6 an Bio-Gel P 2 in H_2O; von links Fraktion 2,3,4,5; aufgenommen im UV-Licht bei 254 nm und bei 280 nm nach Anfärben mit m-Phenylendiamin.

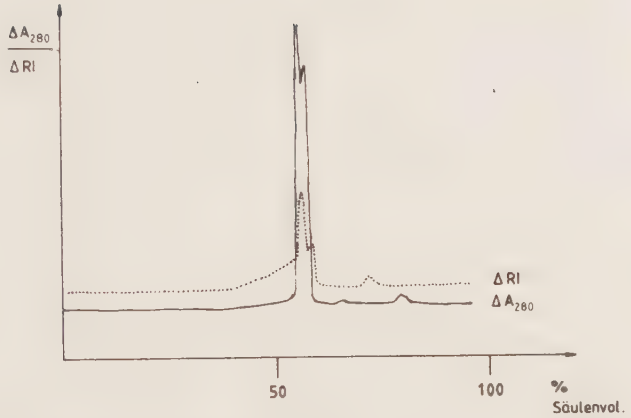


Abb. 5 XVIII. Chromatographie des Hydrolysats der Fraktion LAC 6 an Bio-Gel P 2 in H_2O.

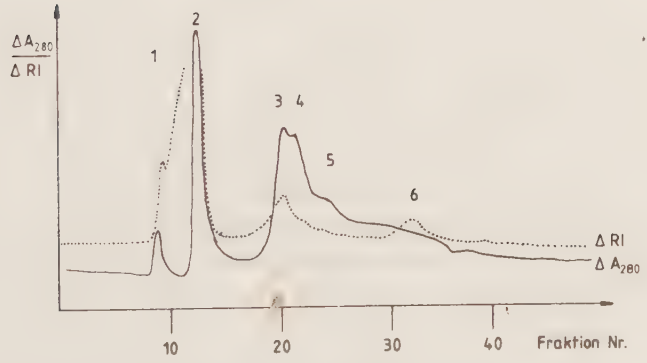


Abb. 5 XIX. Chromatographie der Fraktion LAC 10 am Kationenaustauscher DOWEX AG 50 WX 4.

trum der höhermolekularen Komponenten deutliche Hinweise auf die Gegenwart von Zucker (1000 - 1100 cm^{-1}), die anderen Banden sind aber mit dem vorherigen identisch (Spektrum 28). Möglicherwiese liegen in der Fraktion LAC 6 also gleiche Komponenten mit und ohne gebundenem Zucker nebeneinander vor. Eine niedermolekulare, im UV nicht absorbierende Substanz konnte als freier Zucker identifiziert werden.

Das Hydrolysat der Fraktion zeigt ein nahezu identisches Elutionsprofil (Abb. 5 XVIII). Die UV-Absorption im Bereich oberhalb der Molekülmasse 800 ist fast völlig verschwunden, der RI-Detektor zeigt aber an, daß auch in diesem Bereich noch Substanz eluiert wird. Die beiden scharfen Maxima sind unverändert erhalten, was bedeutet, daß die Substanzen nicht hydrolyseempfindlich sind. Der Anteil der Substanz mit der kleineren Molekülmasse hat etwas zugenommen.

5.3.2 Chromatographie an Kationenaustauscher

Die Fraktionen LAC 10 und LAC 11 konnten durch Chromatographie an dem Kationenaustauscher Dowex AG 50 WX 4 weiter fraktioniert werden. Mit Wasser lassen sich wenigstens 6 Fraktionen, unterschiedlich gut getrennt, eluieren (Abb. 5 XIX). Die Elutionsprofile von LAC 10 und LAC 11 zeigen keine großen Unterschiede. Qualitative Zuckeranalysen zeigen, daß zunächst Zucker oder oligosaccharidreiche Bestandteile eluiert werden (1. und 2. Fraktion) und dann zuckerarme (Abb. 5 XX). Bei letzteren ist nur ein einziger, sonst selten vorkommender Zucker vorhanden, der nach der gleichen Retentionszeit eluiert wird, wie die Rhamnose. Jedoch können auch Dimere in diesem Bereich des Chromatogramms auftreten. Da in diesen Fraktionen die Lignin-Bruchstücke dominieren, müßte der Zucker direkt an das Lignin gebunden sein. Um ihn zu isolieren und eindeutig zu identifizieren, ist die Menge zu klein.

Die Infrarot-Spektren bestätigen diese Befunde: die Spektren der ersten beiden Fraktionen zeigen nur wenige, breite Ban-

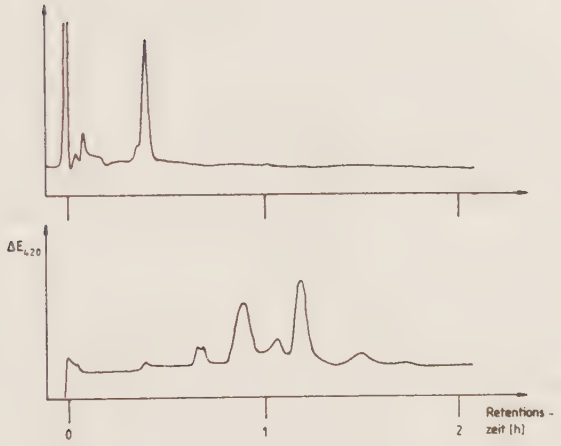


Abb. 5 XX. Trennung der Hydrolysate der Fraktionen LAC 10 K 1 und LAC 10 K 3 im automatischen Zuckeranalysator.

den, wobei vor allem die für Kohlehydrate typische intensive Absorption im Bereich zwischen 1000 und 1200 cm^{-1} auffällt (Spektrum 29). Die Banden in den drei später eluierten, nicht sauber getrennten Fraktionen sind zwar ähnlich breit, die Absorption in dem betreffenden Bereich ist aber sehr schwach (Spektrum 30). Die Breite der Banden bei diesen Fraktionen legt die Vermutung nahe, daß hier noch zahlreiche Substanzen miteinander vermengt sind.

Die Fraktionen werden im Folgenden als LAC 10 K 1 - 6 bezeichnet. Auf Grund welcher Eigenschaften sie vom Kationenaustauscher getrennt werden, ist unklar.

5.4 Vierte Stufe: Gelfiltrations-Chromatographie der Fraktionen aus Kationenaustauscher-Trennung

Die Trennung der LAC 10 K-Fraktionen war zunächst nur als analytische Untersuchung durchgeführt worden, um die Einheitlichkeit der Austauscher-Fraktionen zu überprüfen. Da sich aber bei der Betrachtung der Elutionsprofile zeigte, daß die Fraktionen wiederum nicht nur uneinheitlich sind, sondern offenbar aus zahlreichen Komponenten bestehen, muß in dieser Chromatographie eine weitere Trennstufe gesehen werden. Die Abb. 5 XXI zeigt das Ergebnis der Trennung. Die Aufzeichnung der UV-Absorption erweckt zwar bei einigen Proben den Eindruck, daß einige Komponenten sauber getrennt sind, vergleicht man damit aber die Aufzeichnung des RI-Detektors, so sieht man nur eine sehr verwischte Aufzeichnung. Somit muß angenommen werden, daß auch diese Stufe der Trennung noch nicht zu reinen Substanzen führt.

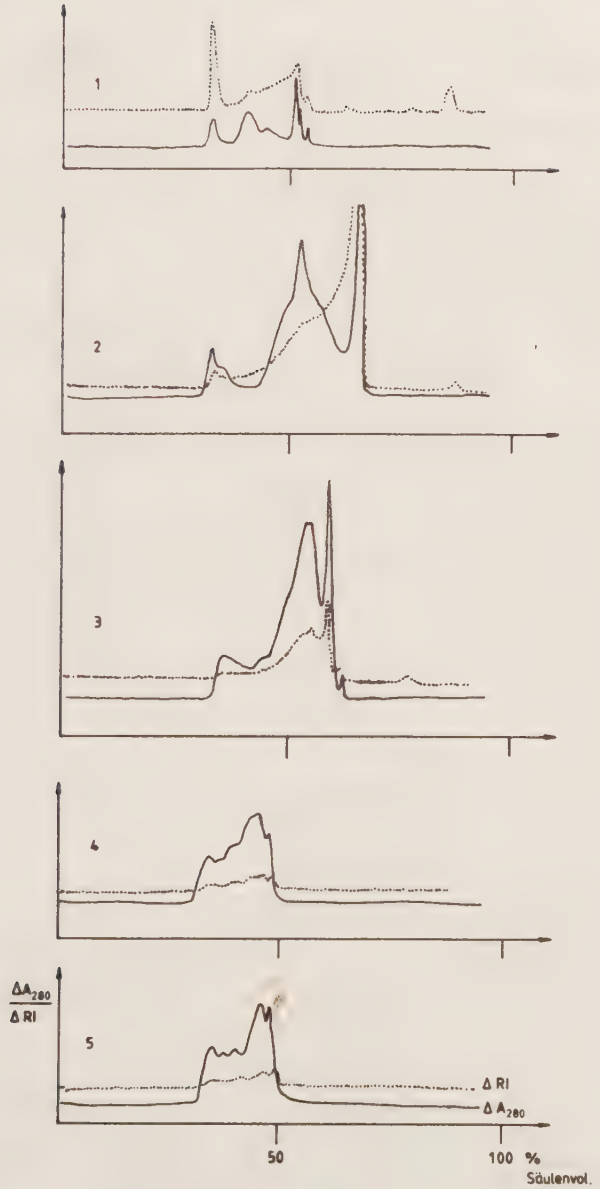


Abb. 5 XXI. Trennung der Fraktionen LAC 10 K 1 - 5 an Bio-Gel P 2 in H_2O.

6. Diskussion und Zusammenfassung der Ergebnisse

6.1 Arbeitsweise

Es war das Ziel der in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Versuche, niedermolekulare Verbindungen zu gewinnen, in denen Ligninanteile und Zucker kovalent aneinander gebunden sind. Diese Verbindungen sollten so beschaffen sein, daß eine vollständige Aufklärung ihrer Molekülstruktur durchgeführt werden könnte. Zwei verschiedene Ausgangsmaterialien waren dafür vorgesehen: zum einen der mit 5%iger KOH extrahierbare Anteil der Chlorit-Holocellulose, zum anderen das Gemisch von Syntheseprodukten, das bei einer katalytischen Dehydrierung von Coniferylalkohol in der Gegenwart von Zucker entsteht.

Da sich bei den Versuchen mit dem Alkali-Extrakt aus der Holocellulose bald herausstellte, daß dieser offenbar eine erheblich kompliziertere Zusammensetzung besitzt, als allgemein angenommen worden war, mußte der Schwerpunkt der Arbeit auf die Fraktionierung gelegt werden und alle Untersuchungen auf das Ziel hin ausgelegt, möglichst schnell zu reinen Substanzen zu gelangen. Versuche zur Charakterisierung von Zwischenprodukten konnten nur in dem Maße durchgeführt werden, als sie für die Entscheidung von Bedeutung waren, welches Material auf welchem Weg weiterverarbeitet werden sollte. D.h. es galt zu entscheiden:

1. Liegt eine reine Substanz vor?
2. Muß und kann das Verfahren, das betreffende Produkt zu erhalten, noch optimiert werden?
3. Liegen in der Substanz noch Zucker und Ligninbruchstücke gleichzeitig vor und welche Molekülmasse haben sie?
4. Mit welcher Methode lassen sich diese Fragen am schnellsten und einfachsten klären und ist die verfügbare Substanzmenge dafür ausreichend?

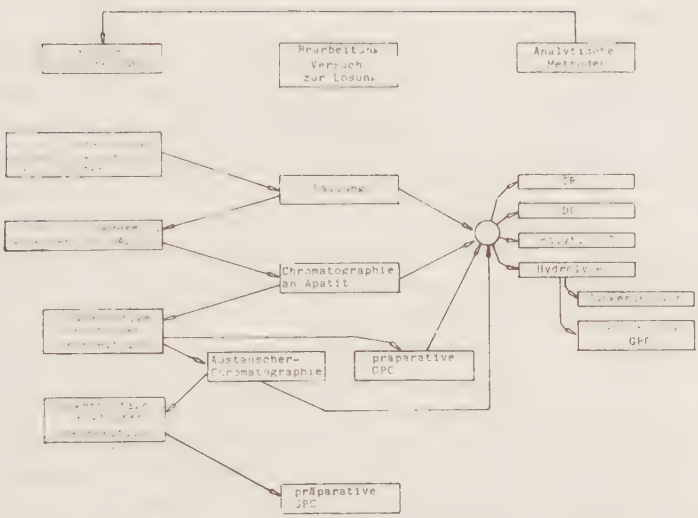


Abb. 6 I. Versuchsablaufplan zur Fraktionierung des Alkaliextrakts aus der Holocellulose.

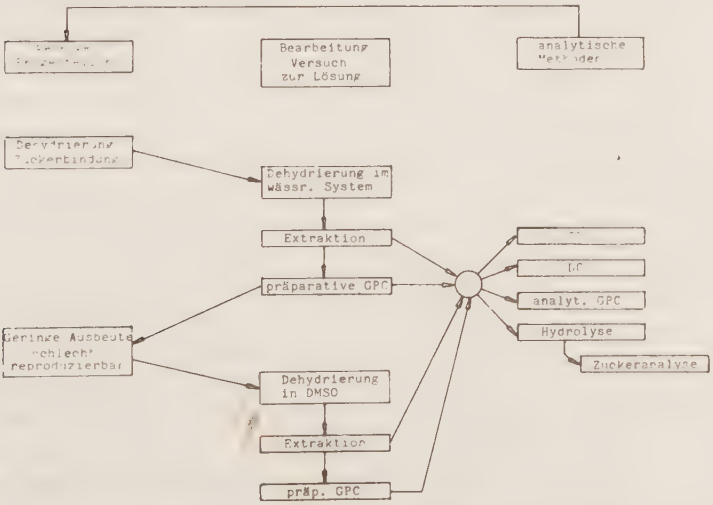


Abb. 6 II. Versuchsablaufplan zur synthetischen Gewinnung von niedermolekularen Lignin-Polysaccharid-Komplexen.

Alle Versuche, die für diese Entscheidung keine Bedeutung hatten, mußten unterlassen werden, und die Arbeit mag aus diesem Grunde an einigen Stellen lückenhaft erscheinen. Die Abb. 6 I stellt die Abfolge der Versuche und Entscheidungen schematisch dar.

Ähnlich war die Situation bei den Syntheseversuchen: hier wurde zunächst nur das Ziel im Auge behalten, überhaupt ein zukkerhaltiges Produkt herzustellen, wobei auf Grund der Literaturangaben keine Schwierigkeiten zu erwarten waren. Auf Details der Versuchsbedingungen wurde nicht weiter geachtet. Erst im Verlauf der Versuche stellte sich heraus, daß zunächst grundlegende Untersuchungen zur Wahl der richtigen Versuchsbedingungen nötig sind. In der Abb. 6 II sind die Versuche zu einem Ablaufplan geordnet.

6.2 Syntheseversuche

Bei den in Abschnitt 4 beschriebenen Syntheseversuchen wurden zwei Systeme erprobt. Bei beiden lagen die Mengenverhältnisse und die Konzentrationen der Reaktionspartner, die Menge an Katalysator und die Reaktionszeit in der gleichen Größenordnung, unterschiedlich waren das Reaktionsmedium und die Aktivität des Katalysators.

Das erste, wäßrige System liefert oligomere Produkte, die möglicherweise Zucker enthalten können, nur mit sehr geringer Ausbeute (etwa 1%). Das Material war daher zu wenig, um genaue Untersuchungen durchführen zu können, ob und wie Zucker an die Folgeprodukte der Dehydrierung gebunden war. Die Molekülmasse betreffenden Anteils liegt etwa um 1000, er tritt bei Fraktionierung stets gleichzeitig mit Substanzen auf, deren Molekülmasse maximal zwischen 4000 und 5000 liegt. Das gleichzeitige Auftreten von zwei Anteilen höherer und niederer Molekülmasse wurde bei Lignin schon mehrmals beobachtet und z.T. mit der Bildung von Assoziaten erklärt (Connors et

al. 1980, Glasser 1981, Wayman und Obiaga 1974). Dafür, daß das auch in diesem Fall so sein könnte, sprechen die Unregelmäßigkeiten in der Menge und Molekülmassen-Verteilung der Substanzen, die sich bei mehreren Untersuchungen an derselben Präparation zeigten, sowie daß höher- und niedermolekulare Anteile dasselbe Infrarot-Spektrum besitzen. Den größten Anteil unter den Produkten der Reaktion bilden einerseits Substanzen, die auch dann entstehen, wenn das Reaktionsmedium keine Zucker enthält und andererseits unlösliche Polymere, die selbst dann entstehen, wenn noch nicht umgesetzter Coniferylalkohol im Reaktionsgemisch vorliegt.

Im zweiten System, das nur geringe Mengen Wasser enthält, werden dagegen auch Produkte mit einer Molekülmasse unter 800 gebildet, aus denen sich Arabinose hydrolytisch freisetzen läßt. Polymere finden sich nicht unter den Produkten.

Bei beiden Systemen ist die Vorstellung, ähnliche Bedingungen könnten bei der Biosynthese eine Rolle spielen, durchaus realistisch: Einerseits muß man annehmen, daß der Extracellularraum und die Zellwand bei der Ligninbildung von Wasser erfüllt sind, andererseits muß man berücksichtigen, daß Coniferyl- und Sinapylalkohol in Wasser nicht löslich sind und die Reaktion möglicherweise von membrangebundenen Enzymen oder Enzymsystemen katalysiert wird, so daß sie in einer eher hydrophoben Umgebung stattfinden könnte.

Dagegen ist fraglich, ob die Konzentrationsverhältnisse zwischen den Reaktionspartnern realistisch sind. Um die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von zuckerhaltigen Produkten möglichst groß zu machen, wurde ein zwanzigfacher Überschuß von Arabinose gegenüber Coniferylalkohol eingesetzt. Ähnliche Verhältnisse kann man in der Zellwand nicht erwarten, wenn auch nicht völlig ausschließen. Bei den von Freudenberg und Grion (1959) sowie Freudenberg und Harkin (1960) beschriebenen Versuchen lag die Zuckerkonzentration bei 15%, die molaren Verhältnisse der Reaktionspartner

schwankten in einem weiten Bereich. Bei den Arbeiten von Katayama et al. (1980 a, b) wurde mit Glucose-Konzentrationen von 50 bis 75% in Wasser gearbeitet, und es lag ein fünfhundertfacher Überschuß an Zucker gegenüber Coniferylalkohol vor. Derart extreme Bedingungen, denen wohl keinerlei Modellcharakter für ein biologisches System mehr zugeschrieben werden kann, wurden bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen bewußt nicht angewandt.

Die Arbeiten von Freudenberg und Mitarbeitern sowie der japanischen Arbeitsgruppe könnten, trotz der fragwürdigen Reaktionsbedingungen, den Eindruck erwecken, als müssen die dort beschriebenen Verbindungen aus Coniferylalkohol in der Gegenwart von Zuckern entstehen, und zwar in nennenswerten Mengen. Angaben über den Einfluß der Reaktionsbedingungen werden nicht gemacht. Die in den vorhergehenden Kapiteln beschriebenen Versuche zeigen dagegen deutlich, daß bei der Reaktion, allein durch die Wahl des Reaktionsmediums und die Eigenschaften des Katalysators, wenigstens zu einem erheblichen Teil unterschiedliche Produkte erzeugt werden können. Im wäßrigen Medium führen offenbar auch geringfügige, zunächst nicht beachtete Variationen in den Versuchsbedingungen zu anderen Produkten oder Produktverhältnissen, so daß die Versuche keine genau reproduzierbaren Ergebnisse liefern. In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß auch beim Vergleich von polymeren Syntheseprodukten (DHPs) mit Lignin aus Holz Unterschiede beobachtet wurden (Brunow und Lundquist 1980, Nimz et al. 1981).

Da man annehmen muß, daß die Reaktion bei der Biosynthese, wie alle Reaktionen in biologischen Systemen, unter genau definierten Bedingungen stattfindet, kann nicht jeder beliebigen Methode zur Dehydrierung von Coniferylalkohol ein Modellcharakter für die Ligninbiosynthese zugesprochen werden, zumindest dann nicht, wenn die Bildung von bestimmten Strukturelementen

bewiesen werden soll, also z.B. die Bindung von Zuckern oder Polysacchariden an Ligninbausteine. Eine solche Interpretation der Versuche wäre nur sinnvoll, wenn "in vitro" die biologischen Bedingungen genau reproduziert würden. Diese sind aber bis heute nicht bekannt.

Da bei den Syntheseversuchen ein vermutlich kompliziertes Nacheinander und Nebeneinander von Reaktionen abläuft, würden nur detaillierte, vor allem kinetische Untersuchungen eine zweifelsfreie Erklärung für die Bildung der unterschiedlichen Produkte erlauben; bei der großen Zahl der verschiedenen Produkte wären diese relativ aufwendig und langwierig. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit nur zwei "Randbedingungen" von den verschiedenen Varianten untersucht werden konnten, sollen einige Gedanken über die möglichen Ursachen des unterschiedlichen Reaktionsablaufs angeführt werden.

1. Einfluß des Reaktionsmediums: In mehreren Versuchen wurde gezeigt, daß die Bindung von Alkoholen und speziell Zuckern an Ligninbausteine durch Addition an die zunächst gebildeten Chinonmethide stattfinden kann. Diese Reaktion findet auch im wäßrigen Medium statt, wenn auch in geringerem Maße als im wasserfreien (vergl. Kap. 2.5). Setzt man bei den Versuchen in dieser Arbeit den gleichen Mechanismus voraus, so müßte das Reaktionsmedium bereits einen Einfluß auf die Bildung der Chinomethide haben, also auf die Radikalreaktionen. Über Lösungsmitteleinflüsse auf Radikalreaktionen ist derzeit aber wenig bekannt. In diesem speziellen Fall könnte man an einen Einfluß auf die Koordinationssphäre am Katalysator denken.

2. Einfluß des Katalysators: Für die Lebensdauer der Chinomethide wird eine Halbwertszeit von etwa einer Stunde angegeben (Freudenberg und Neish 1968). Für die Reduktion von Wasserstoffperoxid mit Hilfe der Peroxidase liegt die Geschwindigkeitskonstante (k_1) bei 9×10^8 ($L \cdot mol^{-1}\ sek^{-1}$)

(Paul 1963). Für die maximale Anfangsgeschwindigkeit des durch den Komplex $(Cu_2en_3)^{4+}$ katalysierten H_2O_2-Zerfalls wird $v_o = 10^{-2}$ Mol l^{-1} min^{-1} angegeben (Kaden und Sigel 1968). Allerdings wurden die beiden letzten Werte unter optimalen Bedingungen in wäßriger Lösung bestimmt, und es ist nicht bekannt, inwieweit z.B. die Gegenwart von Aceton die Aktivität der Peroxidase beeinflußt. Jedenfalls erfolgt die Weiterreaktion der Chinonmethide erheblich langsamer als die Bildung der Radikale. Somit ist die Wahrscheinlichkeit für die Bildung von Polymeren und Oligomeren auf radikalischem Weg umso größer, je schneller die Radikale gebildet werden, während bei einer geringeren Aktivität des Katalysators die Reaktion in höherem Maße über den Chinonmethid-Weg führt, was andere Strukturen ergibt und zunächst die Bildung von Produkten mit niederer Molekülmasse begünstigt. Die Versuche mit Peroxidase und $(Cu_2en_3)^{4+}$ stehen im Einklang mit dieser Vermutung. Ein solches Prinzip wäre auch biologisch sinnvoll, da auf diese Weise bei der Biosynthese die Struktur des Lignins beeinflußt werden könnte, und zwar allein durch die Aktivität des Enzyms, das die Dehydrierung der Bausteine katalysiert.

Fraktionierung des Alakli-Extraktes aus der Holocellulose

Die aus dem Alkaliextrakt der Holocellulose abgetrennte Komponente HAL I ist offenbar der am besten erhaltene Teil des [illegible] frarot-Spektrum erkennen läßt, besitzt sie noch die typischen Eigenschaften des Lignins; sie ist jedoch bereits bis zu einer Molekülmasse von etwa 1000 abgebaut. Nach der Fällung mit Ethanol ist die Substanz nicht mehr in Wasser löslich, sie fällt aber bei der Neutralisierung des Alkaliextrakts noch nicht aus, wird also offenbar durch die Gegenwart der Polysaccharide in Lösung gehalten. Das spricht für eine starke Wechselwirkung zwischen den beiden Komponenten, die durch die

Zugabe von Ethanol aufgehoben wird.

Die Komponente HAP enthält die mit 5%iger KOH extrahierbaren Polyosen. Diese sind durch die Fällung weitgehend vom Lignin befreit worden und dürften damit zu den reinsten bisher präparierten Holzpolyosen gehören. Während die Bestandteile I und III aus relativ reinem Galactoglucomannan bzw. 4-O-Methylglucurono-arabinoxylan bestehen, sind die anderen drei offenbar Gemische wechselnder Zusammensetzung aus beiden. Der geringe Ligninanteil, den sie noch enthalten, könnte dabei als "Bindeglied" zwischen den Polysaccharidanteilen dienen, eine Funktion des Lignins, die schon gelegentlich diskutiert worden ist (Fengel 1976 b, Groß 1979). Es ist aber auch denkbar, daß beide Polyosen Lignin-Abbauprodukte enthalten, deren Eigenschaften gegenüber dem Ionenaustauscher allein das Elutionsverhalten der Substanzen bestimmen, so daß keine eindeutige Differenzierung nach dem Polysaccharidanteil mehr erfolgt.

Die Komponente HAL II schließlich stellt ein Gemisch aus zahlreichen verschiedenartigen, relativ niedermolekularen Substanzen dar, die Abbauprodukte des Lignins und vielleicht auch der Zucker sind. Ob die bei der Hydrolyse freigesetzten Zucker aus "mitgeschleppten" Oligosacchariden stammen oder an die Lignin-Abbauprodukte gebunden waren, läßt sich auf Grund der vorliegenden Ergebnisse nicht mit Sicherheit entscheiden. Über die Anzahl der verschiedenen Lignin-Abbauprodukte, die bei der Delignifizierung entstehen, kann man sich etwa eine Vorstellung machen, wenn man die Versuche von Strumila und Rapson (1978) berücksichtigt, die durch Behandlung von Acetovanillon mit den Bedingungen der Delignifizierung 36 Produkte erhielten. Somit könnten allein dimere Abbauprodukte die aus zwei gleichartigen, aneinander gebundenen Ligninbausteinen entstanden sind, 1296 verschiedene Strukturen besitzen. Da aber bereits Lignin kompliziert gebaut ist und auch verschiedene Zucker an die Bruchstücke gebunden sein können, ist ein Vielfaches an Möglichkeiten denkbar, und selbst wenn

nur ein Bruchteil davon in nennenswerten Mengen entsteht, muß eine Isolierung von einzelnen dieser Komponenten langwierig und schwierig sein.

Hinzu kommt, wie die Chromatographie an Hydroxylapatit und die Untersuchung der Produkte zeigen, daß die Delignifizierung bezüglich der Bestandteile von HAL II keine reproduzierbaren Ergebnisse liefert. Hier mag vor allem die unterschiedliche Löslichkeit der Produkte eine Rolle spielen, so daß sie mehr oder weniger stark ausgewaschen werden. Wie Untersuchungen von Wegener (1975 b, 1976) zeigen, liegen auch in der Aufschluß-Lösung relativ niedermolekulare Lignin-Polysaccharid-Komplexe vor. Die dabei beobachteten Anteile mit einer Molekülmasse um 3000 konnten im Alkaliextrakt nicht gefunden werden; vielleicht handelt es sich dabei um Assoziate aus niedermolekularem Material. Die Natriumchlorit-Delignifizierung ist als Mittel zur Isolierung von möglichst reinen und unbeschädigten Polysacchariden entwickelt worden und liefert dabei gute Ergebnisse. Für eine Untersuchung von Lignin-Abbauprodukten und damit auch der Lignin-Polysaccharid-Bindung müßte die Methode aber offenbar noch optimiert werden. In diesem Zusammenhang fällt auf, daß bei allen Methoden, die für die Isolierung von Lignin-Polysaccharid-Komplexen aus Holz beschrieben worden sind, diese als Verunreinigung oder Nebenprodukt bei der Isolierung von Lignin oder Polysacchariden auftreten (vergl. Kap. 2.5).

Als wichtigstes Ergebnis der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Fraktionierungsversuche muß gesehen werden, daß im Alkaliextrakt aus der Holocellulose, wenn überhaupt, dann nur geringe Mengen an Substanzen vorliegen, die äquivalente Mengen an Ligninabbauprodukten und Zuckern enthalten. Die Polysaccharide und der am besten erhaltene Ligninanteil lassen sich voneinander trennen, wobei jede getrennte Komponente nur noch geringe Mengen von der anderen enthält. Die Zusammensetzung aus zwei Hauptkomponenten war zwar vor einiger Zeit bei gelchromatograpischen Untersuchungen beobachtet worden

(Kringstad und Cheng 1969), ihre Bedeutung wurde aber offenbar nicht erkannt. Das darüberhinaus vorhandene Gemisch an Abbauprodukten erwies sich als zu heterogen, um daraus auf einfachem Weg Substanzen der gewünschten Zusammensetzung isolieren zu können.

Das Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß bei zahlreichen anderen Lignin-Polysaccharid-Komplexen die Situation ähnlich ist. Bei der Untersuchung der zuckerhaltigen Komponenten, die beim schonenden Abbau von Milled Wood Lignin entstehen, deutet sich z.B. eine ähnliche Vielfalt an (Wegener 1980). Da bei den bisherigen Untersuchungen über Lignin-Polysaccharid-Komplexe nur einige wenige einfache Reinigungs- und Fraktionierungsschritte durchgeführt wurden (vergl. Kap. 2.5), liegt die Vermutung nahe, daß wenigstens zum Teil nicht eine Bindung, sondern eine unzureichende Trennung vorlag; manche scheinbare "Spaltung" von Bindungen könnte in Wirklichkeit eine Trennung von Assoziaten gewesen sein.

Die mehrmals beschriebene Anreicherung von Arabinose in ligninreichem Material (Fengel und Wegener 1979, Kringstad und Cheng 1969, Wegener 1976) konnte auch hier bestätigt werden. Einige Fraktionen aus einer Apatittrennung, die einen vergleichweise hohen Zuckergehalt aufweisen, enthielten offenbar vor allem Bruchstücke des 4-O-Methyl-glucurono-arabinoxylan, indenen die Arabinose überwog. In einer Fraktion war sogar (erstmalig) nur Arabinose nachweisbar. Die Substanzmenge war aber für eingehendere Untersuchungen zu gering. Dagegen konnten keine Anzeichen für eine Sonderstellung der Galactose gefunden werden, die gelegentlich auch vermutet worden war (Eriksson et al. 1980, Kringstad und Cheng 1969). Bisher noch nicht beobachtet worden war die Anreicherung von Rhamnose oder anderen Desoxizuckern, wie sie bei einigen LAC-Fraktionen und Fraktionen aus der Kationenaustauschertrennung gefunden worden war. Dabei ist aber zu bedenken, daß der Zucker

unter den gegebenen Bedingungen nicht eindeutig identifiziert werden konnte; außerdem wäre denkbar, daß Desoxyzucker bei der Delignifizierung entstehen.

Schließlich ist noch bemerkenswert, daß sich die Arabinose bereits vor der Hydrolyse in den Fraktionen nachweisen ließ. Da das in mehreren, deutlich voneinander getrennten Fraktionen der Fall war, kann es sich nicht um verschlepptes Material handeln. Zudem ergab die Infrarot-Spektroskopie den Hinweis, daß in einer Fraktion nebeneinander höhermolekulares zuckerhaltiges neben niedermolekularem, zuckerfreiem, sonst aber offenbar identischem Material vorlag. Es muß also eine teilweise Abspaltung des Zuckers in der schwach basischen Eluat-Lösung stattgefunden haben. Dies ist merkwürdig, da die Substanzen vorher erheblich drastischere Bedingungen überstanden hatten. Da Glycoside in alkalischer Lösung stabil sind, kann man an die Spaltung von Benzyläthern denken, die von verdünnten Alkalien hydrolysiert werden (Johansson und Miksche 1972) und bereits mehrmals als Bindungsstellen für Zucker und Lignin diskutiert worden sind (Bezúch und Polčin 1978, Košiková et al. 1979, Merewether und Samsuzzamann 1972).

6.4 Zusammenfassung

Als notwendige Voraussetzung für die Untersuchungen an den Lignin-Polysaccharid-Komplexen wurden einige Methoden zur Fraktionierung und Charakterisierung entwickelt und verbessert. Für die Gelpermeations-Chromatographie haben sich mehrere Systeme mit wäßrigen und organischen Elutionsmitteln bewährt, die zu einer Trennung der untersuchten Substanzen geeignet waren und deren Trennbereich nach der Molekülmasse geeicht werden konnte. Daneben erlangte die Chromatographie am Kationenaustauscher und an Hydroxylapatit Bedeutung. Die Infrarot-Spektroskopie konnte für qualitative Untersuchungen, vor allem von Lignin-Abbauprodukten eingesetzt werden. Darüber hinaus

gelang die Entwicklung einer Methode, mit der Infrarot-Spektroskopie quantitative Untersuchungen am Lignin durchzuführen.

Bei den Versuchen zur katalytischen Dehydrierung von Coniferylalkohol in der Gegenwart von Zucker zeigte sich, daß die Zusammensetzung der Produktgemische sehr stark von den Reaktionsbedingungen abhängt. In wäßriger Lösung, unter Katalyse einer Peroxidase, entstehen größtenteils Polymere und niedermolekulare Substanzen, die sich nicht von denen aus zuckerfreien Ansätzen unterschieden. Nur etwa 1% andersartige Oligomere werden gebildet. Dagegen entstehen in DMSO unter Katalyse eines Kupfer-Ethylendiamin-Komplexes größere Mengen an niedermolekularen Produkten, aus denen sich Zucker hydrolytisch abspalten läßt.

Aus dem Alkaliextrakt der Holocellulose lassen sich ein Lignin- und ein Polysaccharid-Anteil abtrennen, die nur noch geringe Mengen der jeweils anderen Komponente enthalten. Daneben liegt ein Gemisch von sehr verschiedenartigen, relativ niedermolekularen Substanzen vor, bei denen es sich offenbar hauptsächlich um Lignin-Abbauprodukte handelt. In drei Stufen chromatographischer Trennung ließen sich daraus keine reinen Substanzen isolieren. Es gelang aber die Anreicherung von zuckerhaltigen Komponenten, bei denen offenbar Arabinose und möglicherweise Desoxyzucker eine bevorzugte Stellung bei der Bindung an die Lignin-Abbauprodukte einnehmen.

Die Versuche zeigen, daß nicht jedes beliebige System zur katalytischen Dehydrierung von Coniferylalkohol als Modell für die Bildung bestimmter Strukturen im Lignin betrachtet werden kann, solange die natürlichen Bedingungen nicht genau bekannt sind. Zum anderen gelang der Nachweis, daß Lignin-Polysaccharid-Komplexe nicht immer einheitliche Materialien sein müssen, in denen die beiden Komponenten kovalent aneinander gebunden sind, sondern daß es sich auch um Gemische aus zahlreichen, schwer trennbaren Komponenten handeln kann, bei denen

eine kovalente Bindung allenfalls eine untergeordnete Rolle spielt.

7. Materialien, Geräte und Arbeitsvorschriften

7.1 Holz

Das Holz war aus dem Stamm einer etwa 120 Jahre alten Fichte (Picea abies Karst.) aus dem Bayerischen Wald; es war in einer Schlagkreuzmühle gemahlen worden und durch Sieben wurde der Anteil mit einer Teilchengröße von 0,05 bis 0,315 mm abgetrennt. Sie wurden bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Gefäß gelagert. Vom Holz der Rotbuche (Fagus sylvatica L.) stand gemahlenes Material mit der gleichen Teilchengröße aus einem etwa 100-jährigen Stamm aus dem Forstamt Dießen zur Verfügung. Vor der Delignifizierung wurde das Holz durch Extraktion mit Ethanol/Benzol und Ethanol von den "Extraktstoffen" befreit (TAPPI-Standard T-12 m 1959).

7.2 Lösungsmittel, Reagenzien und andere Chemikalien

Die meisten Chemikalien wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen. Andere Bezugsquellen waren:

Fa. Roth, Karlsruhe: Coniferylalkohol, Sennosid A, Quercitrin;

Fa. Serva, Heidelberg: Stachyose, Maltotriose;

Fa. Waters, Königstein: Polypropylenglycol- und Polystyrolstandards für die Eichung der GPC-Säulen;

Fa. Schleicher und Schüll, Dassel: Filterpapier;

Fa. Macherey und Nagel, Düren: Glasfaserfilter;

Deutsche Monopolgesellschaft für Branntwein: Ethanol.

Die Chemikalien konnten in der Regel in der gelieferten Qualität (meist p.a.) verwendet werden. Dimethylformamid wurde nach der im "Handbuch der präparativen Organischen Chemie" ("Houben Weyl"), Bd. 2, beschriebenen Methode nachgereinigt und über eine Säule mit Molekularsieb 4 Å (Zeolith) getrocknet. Diese besondere Behandlung war nötig, da für die GPC eine gleichbleibende Qualität erforderlich war und DMF sich

bei längerer Lagerung teilweise zersetzt. Gebrauchtes DMF wurde gesammelt und regeneriert. Alle anderen Lösungsmittel wurden nach Gebrauch verworfen.

Das verwendete Wasserwar in einer Ionenaustauschanlage entsalzt worden (Seradest S 1100). Der Leitwert betrug zwischen 1 und 4 µS/cm.

Die Materialien für die Chromatographie wurden von den folgenden Firmen geliefert:
Fa. Macherey und Nagel, Düren: Nano-DC-Platten;
Pharmacia, Uppsala/Schweden: Sephadex-Gele (Qualität "fine");
Bio-Rad, Richmond/USA: Biogel P 2 (200 - 400 mesh);
Serva, Heidelberg: Dowex AG 1 X 2, Dowex AG 50 WX 4 (200 - 400 mesh).

Hydroxylapatit wurde nach der Methode von Tiselius hergestellt wie sie von Bernardi (1965) beschrieben wurde.

7.3 Arbeitsweise Dünnschichtchromatographie

Als Entwicklungskammer für die Dünnschicht-Platten dienten Petrischalen (Abb. 7 I). Die horizontale Entwicklung der Platte soll zum einen eine gleichmäßige Lösungsmittel-Sättigung der Atmosphäre an der Kieselgelschicht ermöglichen, zum anderen Einflüsse der Schwerkraft ausschließen. Die Detektion erfolgte entweder durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm oder, bei Platten ohne Fluoreszenz-Indikator, durch Besprühen mit einer Lösung von m-Phenylendiamin (3,5%ig in 70%igem Ethanol) und anschließendes Erhitzen auf 120° C. Die Färbung ist bei einfacher Betrachtung im Tageslicht zu erkennen, besser oft die Fluoreszenz bei 280 nm.

Es wurden die folgenden Laufmittel verwendet:
I. Toluol/Methylethylketon/Dimethylformamid 25/25/1
II. Pyridin/Butylacetat/Ethanol/Wasser 2/8/2/0,5
III. Ethylacetat/Eisessig/Wasser 10/4/3.

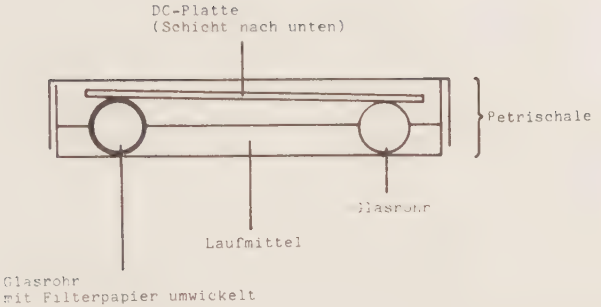


Abb. 7 I. Vorrichtung für die Chromatographie auf Nano-DC-Platten.

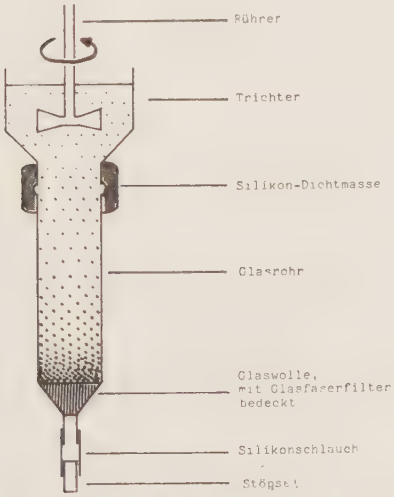


Abb. 7 II. Vorrichtung zum Füllen der Chromatographie-Säulen

7.4 Säulenchromatographie

Als Säulen für die Chromatographie dienten im allgemeinen handelsübliche Glasrohre, die am unteren Ende konisch zu einer Spitze ausgezogen waren. Der konische Teil wurde mit Glaswolle gefüllt, deren Oberfläche mit einem passenden Stück Glasfaserfilter abgedeckt wurde. Nach dem Füllen wurde das obere Ende des Gelbettes ebenfalls mit einem Glasfaserfilter abgeschlossen. Die Säule wurde mit einem Gummistopfen verschlossen (am zweckmäßigsten erwies sich Silikongummi), in den luftdicht ein Stück Schlauch eingepaßt worden war. Die Zu- und Ableitungsschläuche waren aus Polyethylen oder Teflon, die Verbindungsstücke aus Silikongummi.

Zum Füllen wird auf den Säulen ein Trichter befestigt; dazu dient entweder ein durchbohrter Gummistopfen, oder der Trichter wird mit Silikon-Dichtmasse festgeklebt (letztere läßt sich mit einem scharfen Messer wieder entfernen). Die Säule wird unten verschlossen, zu etwa 2/3 mit Lösungsmittel gefüllt und die Suspension des Füllmaterials (im Lösungsmittel) in den Trichter gegossen. Die Suspension sollte mindestens das doppelte Volumen des geplanten Säulenvolumens haben. Insbesondere bei sehr feinkörnigen Materialien (Hydroxylapatit) ist ein ständiges Rühren im Trichter ratsam, um ein gleichmäßiges Absetzen des Säulenmaterials zu garantieren (Abb. 7 II) Nach dem Absetzen kann der normale Lösungsmittel-Durchfluß beginnen, wobei sich die Säule meistens etwas weiter setzt; gegebenenfalls muß noch etwas Säulenmaterial nachgefüllt werden. Vor dem Auftragen der ersten Probe sollte die Säule mit etwa dem zweifachen Säulenvolumen an Lösungsmittel gespült werden; außerdem muß beim Eluieren der ersten Probe mit Unregelmäßigkeiten gerechnet werden.

Die meisten GPC-Säulen hatten 100 cm Betthöhe, ausgenommen die Sephadex-LH 60-Säulen, die bis zu einer Betthöhe von 140 cm gefüllt wurden, um die gröbere Korngröße des Füllmate-

rials zu kompensieren. Der Durchmesser der Säule betrug 0,7, 1,0 und 1,2 cm für analytische Zwecke und für die präparative Trennung von kleinen Mengen, 2,2 cm für die präparative Trennung von größeren Substanzmengen. Die Säulen mit Hydroxylapatit und DEAE-Sephadex A-25 hatten 2,2 cm Durchmesser und etwa 35 cm Länge. Die verschiedenen Bedingungen sind in der Tabelle 7 I zusammengefaßt.

Die Registrierung der Substanzen im Eluat erfolgte mit einem Durchfluß-Photometer (LKB Uvicord II) bei 280 nm. Für einige Versuche stand ein Durchfluß-Differential-Refaktometer (Melz LCD 201) zur Verfügung, mit dem auch Substanzen erfaßt werden konnten, die nicht im UV-Bereich absorbierten.

Die Elutionsmittel wurden mit Peristaltikpumpen (LKB 120 000 Varioperpex und Ismatec 1p4) transportiert, im Falle von DMF nur durch Atmosphären-Druck, da sonst Material aus den Pumpenschläuchen (Silikongummi) eluiert wurde. Die Eluate wurden in einem Fraktionssammler (LKB Ultrorac) aufgefangen. Die Lösungsmittelgradienten wurden beim Pumpenbetrieb mit einer automatischen Mischanlage (LKB 113 000 Ultrograd) hergestellt, beim Betrieb mit Atmosphärendruck mit einem Glas-Gradientenmischer (Abb. 7 III).

Die Gradientenelution bei einer Apatitsäule von 2,2 cm Durchmesser und 35 cm Länge geschah folgendermaßen:

1. Äquilibrieren der Säule mit DMF
2. Auftragen der Probe (in etwa 10 - 20 ml DMF)
3. 20 ml DMF
4. Gradient DMF - H_2O, je 250 ml
5. 150 ml H_2O
6. Gradient H_2O-Na-citrat-Lösung (50 mmolar), je 200 ml
7. Na-citrat-Lösung (50 mmolar) bis zur vollständigen Elution der Substanz.
8. Regenerieren der Säule mit etwa 300 ml Na_2HPO_4-Lösung (200 mmolar).

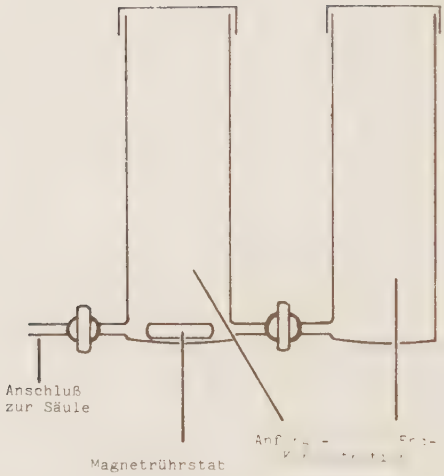


Abb. 7 III. Glas-Gradientenmischer

Tab. 7 I. Dimensionen der verwendeten Chromatographiesäulen

[illegible] (...)	Durchmesser (cm)	Bettlänge (cm)	...volumen (ml)	max. Probenmenge (mg)
Sephadex [illegible] (...oac-Puffer)	0,7	100	38	
Sephadex LH-20 (DMF)	0,7 1,2	100 100	38 113	2 6
Sephadex LH-60 (DMF)	0,7 2,2	140 140	53 532	2 30
Bio-Gel P 2 (H_2O)	1,2 2,2	100 100	113 380	6 25
DEAE-Sephadex A-25 (Gradient)	2,2	35	152	200
Dowex AG 50 WX 4 (H_2O)	1,0	100	78	50
Hydroxylapatit (Gradient)	2,2	35	152	200

Die Säule sollte nach dem zweiten oder spätestens dritten Lauf neu gepackt werden.

7.5 Delignifizierung

Die in der Arbeitsgruppe übliche Methode zur Delignifizierung konnte übernommen werden (Wegener 1974), sie wurde lediglich der Verarbeitung größerer Mengen angepaßt ("präparativer Maßstab"). Die benutzte Apparatur zeigt die Abb. 7 IV. Mit ihr war es möglich, das freiwerdende Chlor abzusaugen und zu absorbieren. Bei einem Ansatz wurden 36 g Holzmehl verarbeitet und 5mal die 17,1 g "Aktivchlor" entsprechende $NaClO_2$-Lösung zusammen mit 5,3 ml Eisessig innerhalb fünf Minuten durch den Tropftrichter zugegeben. Nach Beendigung der Reaktion wurden Tropftrichter, Kugelkühler und Waschflasche entfernt und der Kolben vorsichtig evakuiert, um den Großteil des überschüssigen Chlors zu entfernen.

7.6 Gewinnung und Aufarbeitung des Alkali-Extrakts aus der Holocellulose

Die Extraktion wurde nach der in der Arbeitsgruppe üblichen Methode durchgeführt, jedoch ohne Stickstoff-Spülung. Als Reaktionsgefäß diente ein Zweihals-Kolben mit KPG-Rührer und Tropftrichter. Die Holocellulose wurde in Wasser suspendiert und dann 10%ige KOH bis zur Endkonzentration von 5% zugetropft. Die Neutralisation des Extrakts erfolgte mit einem schwach saueren Kationenaustauscher ("Lewatit CP 3050" Bayer, bezogen über Merck, Darmstadt); dieser wurde etwa 10 cm hoch in eine Nutsche gefüllt und vorsichtig mit dem Extrakt überschichtet. Nach dem Durchlaufen des Extrakts wurde so lange mit Wasser nachgewaschen, bis die durchlaufende Lösung farblos war. Der nunmehr neutrale Extrakt wurde auf etwa 30 - 40 ml eingeengt, falls erforderlich erneut über eine kleine Lewatit-Säule neutralisiert, wieder auf dasselbe Volumen ein-

geengt und gegebenenfalls eine Trübung abzentrifugiert. Dann wurde sofort, tropfenweise und unter Rühren, die fünffache Menge Ethanol zugegeben (96%ig, vergällt), etwa innerhalb 30 Minuten. Dabei fällt ein cremefarbener Niederschlag aus. Nachdem die Suspension über Nacht im Kühlschrank gestanden hatte, wurde sie zentrifugiert und das Sediment einmal unter Eiskühlung mit Ethanol/H_2O 5/1 gewaschen. Dafür erwies sich die Verwendung eines Homogenisators nach Potter als zweckmäßig. Die Waschlösung wurde verworfen. Der Überstand der Fällung wurde auf etwa 30 ml eingeengt (d.h. bis zur vollständigen Entfernung des Ethanols). Dabei fiel erneut ein cremefarbener Niederschlag aus, der abzentrifugiert wurde. Waschen ist nicht ratsam, da sich die Substanz in einem Überschuß an Wasser wieder löst. Die Niederschläge wurden getrennt im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet, der lösliche Anteil gefriergetrocknet.

7.8 Infrarot-Spektroskopie

Die Messungen in Lösungen wurden in Küvetten mit NaCl-Fenstern durchgeführt. Die Präparation der Filme erfolgte nach der Methode von Hofmann und Zundel (1971). Die dafür nötige, gegenüber der Originalvorschrift etwas modifizierte Zentrifugations-Kammer zeigt die Abb. 7 V. Die Germanium-Fenster (Fa. Metallurgie Hoboken, Hoboken/Belgien, bezogen über Ges. für Elektrometallurgie, Nürnberg) wurden selbst geschliffen und in Teflon-Rahmen eingeklebt (Silikon-Klebstoff "Omnivisk" Fa. Omnitechnik, München), die Klebestellen am Teflon waren vorher mit Ätzmittel (Ex-T-9, bez. von Fa. E. Lübben, München behandelt worden. Die Proben wurden in einer Christ-Junior-Zentrifuge UJ 3 präpariert. Die Infrarot-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer 281-Gerät aufgenommen. Die Zubehörteile wurden außer von Perkin-Elmer, Überlingen, von der Fa. Oriel, Darmstadt, bezogen.

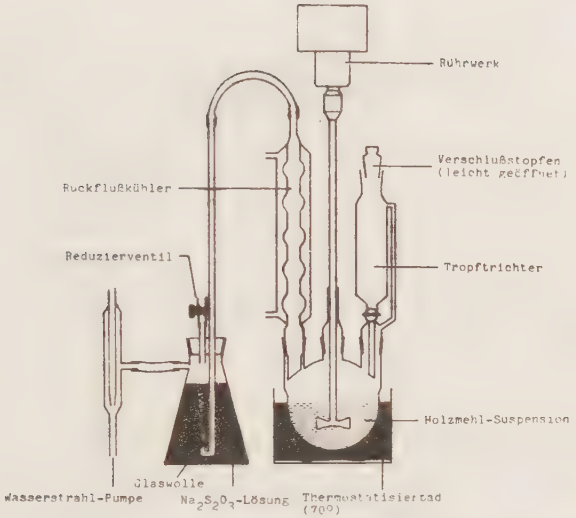


Abb. 7 IV. Apparatur zur Delignifizierung größerer Probenmengen

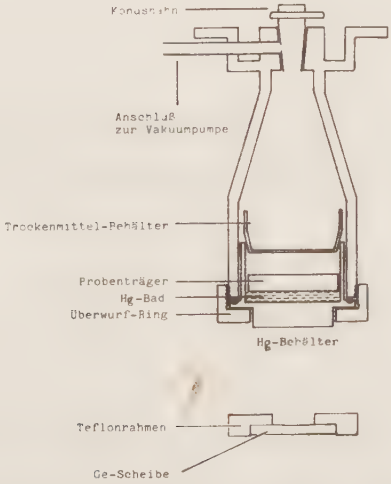


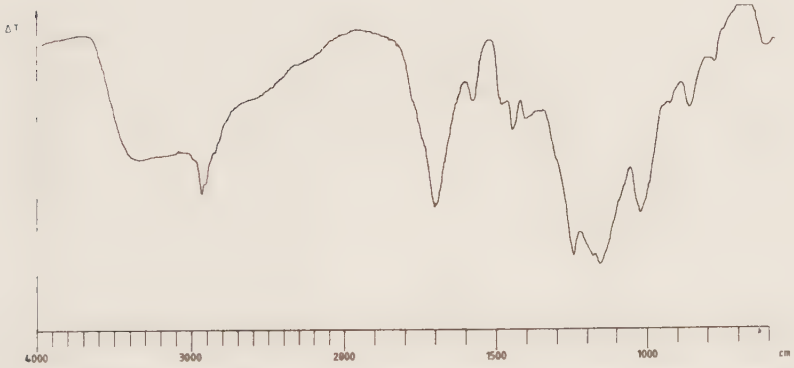
Abb. 7 V. Vakuum-Zentrifugenkammer zur Präparation der Proben für die quantitative Infrarot-Spektroskopie, variiert nach Hofmann und Zundel (1971), sowie zugehöriger Probenträger.

7.9 Verschiedenes

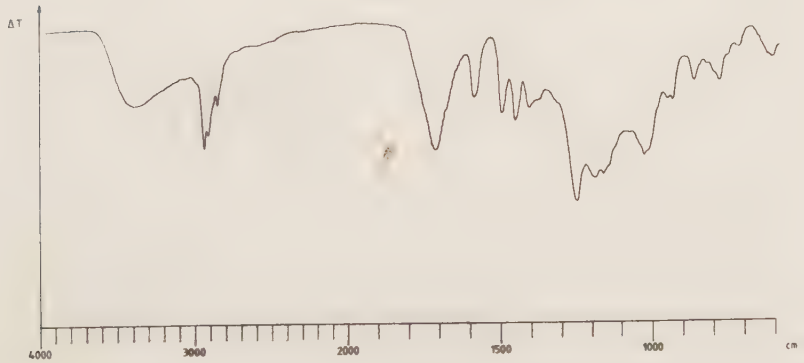
Die für die Untersuchungen eingesetzten Zuckeranalysatoren waren Geräte von der Fa. Biotronik, Frankfurt (ZA 5100 und LC 2000). Die UV-photometrischen Messungen wurden mit einem Bausch und Lomb Spectronic 200-Gerät durchgeführt. Für die Zentrifugationen stand eine MSE-High-Speed-18-Zentrifuge mit Festwinkelrotoren zur Verfügung. Die Schlagkreuzmühle (SK 1) und die Siebe (nach DIN 4188) zur Aufarbeitung des Holzes waren Geräte der Fa. Retsch, Haan. Die Glasbläserarbeiten wurden von der Fa. Schultheiss, München, durchgeführt. Für die Gefriertrocknung stand ein Gerät der Fa. Secfroid (Lyocor M 1901) zur Verfügung.

8. Infrarot-Spektren

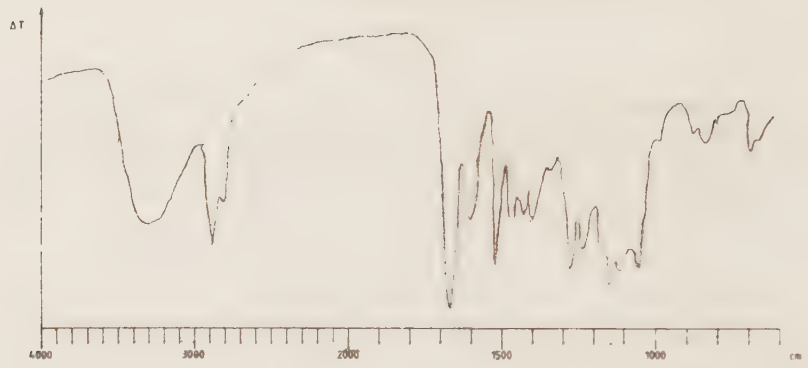
Alle Spektren wurden als Film auf Trägermaterial (Germanium) präpariert. Die Bande bei 635 cm^{-1} wird durch eine Gitterschwingung des Germaniums hervorgerufen.



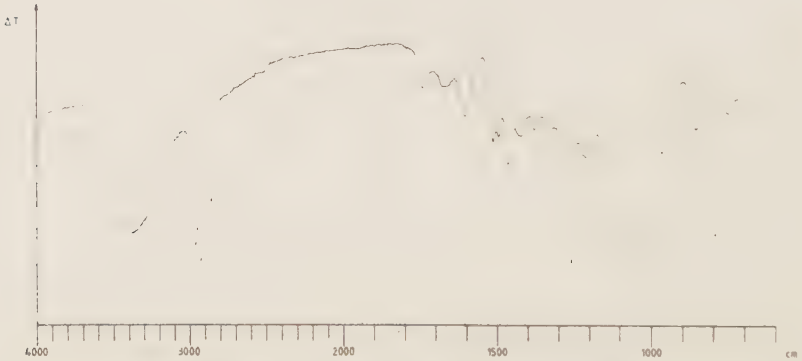
1. Niederschlag aus dem Filtrat des Säurelignins aus Holocellulose.



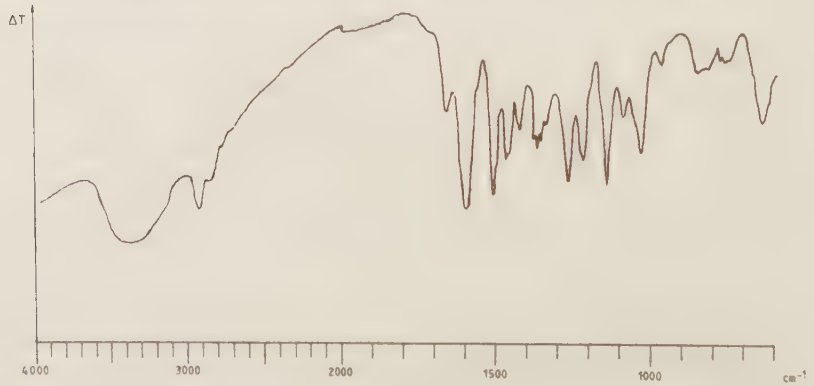
2. n-Butanol-Extrakt aus dem Filtrat des Säurelignins aus Holocellulose.



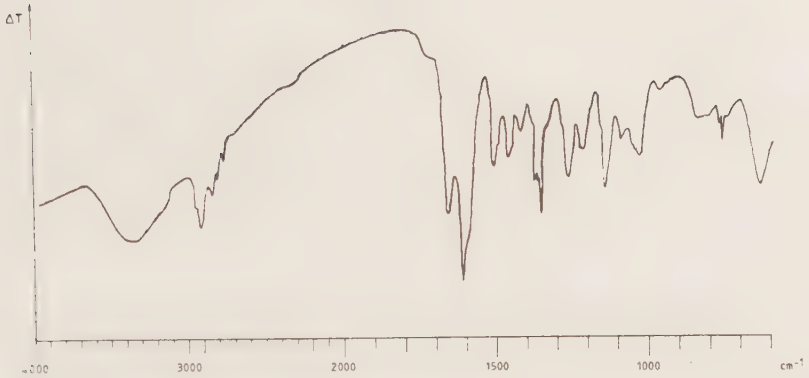
3. Niedermolekulare Komponente aus ButOH-1



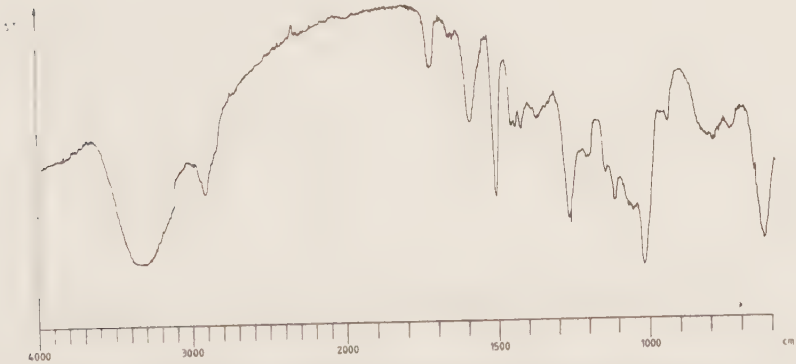
4. Niedermolekulare Komponente aus ButOH-1



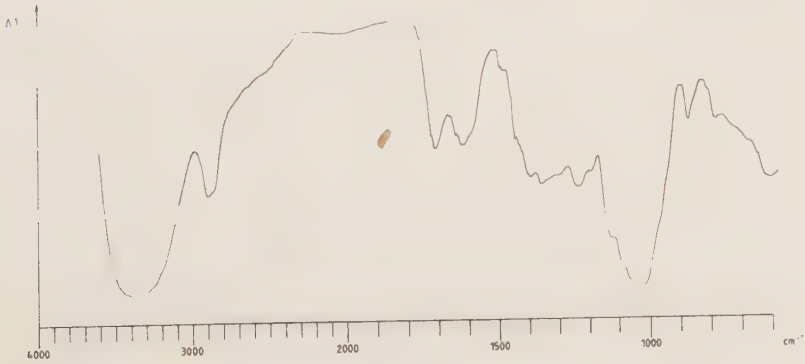
5. Niedermolekulare Komponente aus ButOH-1



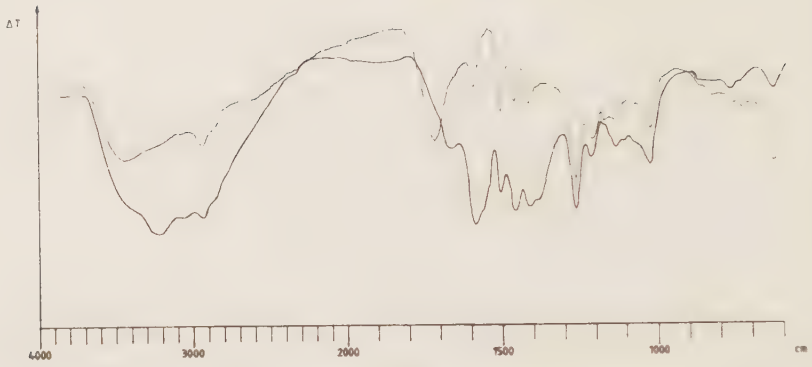
6. Höhermolekulare Komponente aus ButOH-1



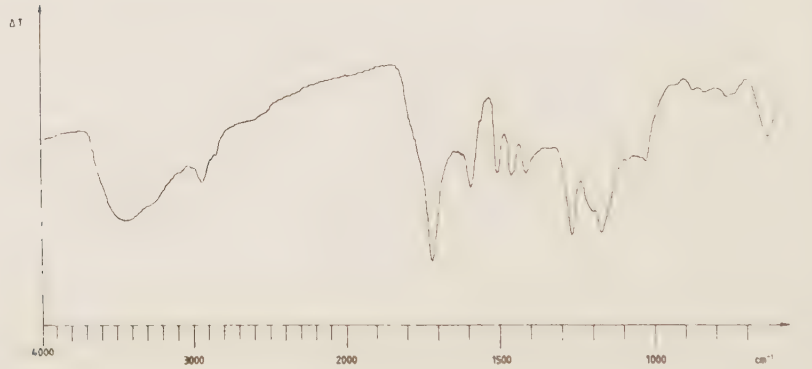
7. n-Butanol-Extrakt aus Dehydrierungsansatz in DMSO mit Arabinose.



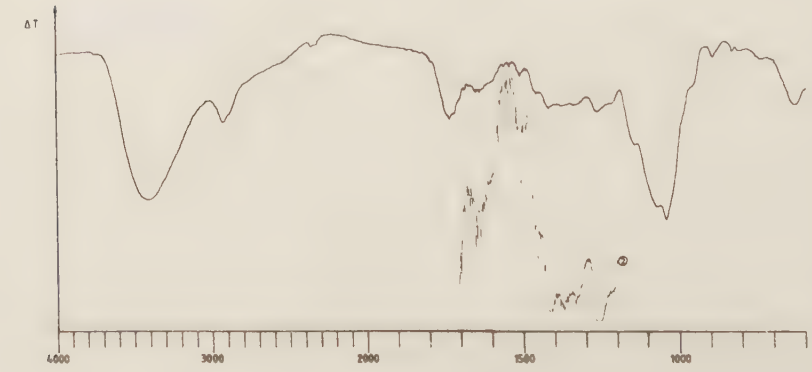
8. HAP aus Fichten-Holocellulose



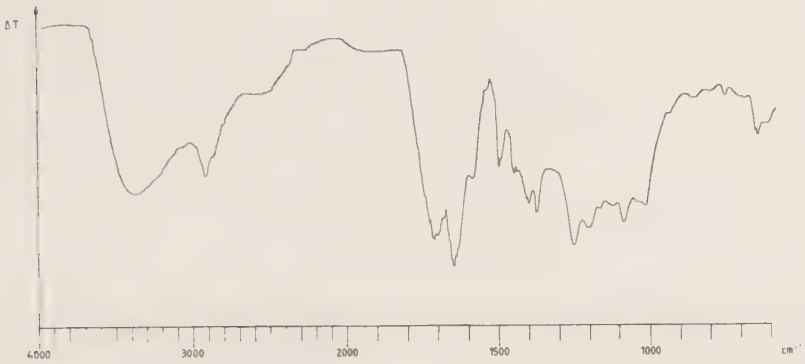
9. HAL I aus Fichten-Holocellulose; aus neutraler (oben) u. alkal. Lösung



10. Säurelignin nach Runkel aus Fichten-Holocellulose



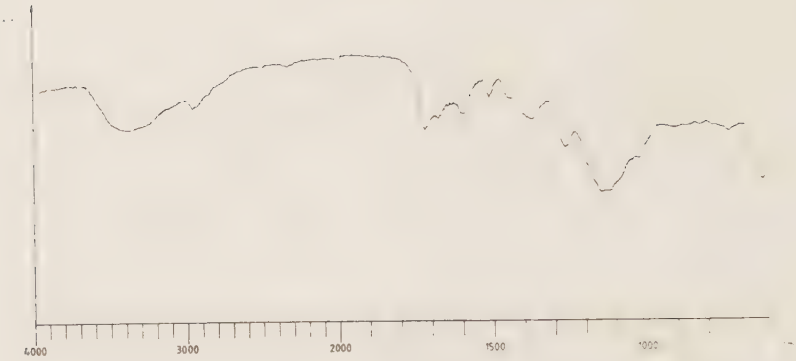
11. Fraktion V aus der Anionenaustauscher Trennung von HAP
(Bereich der Aromatenbanden 10-fach verstärkt)



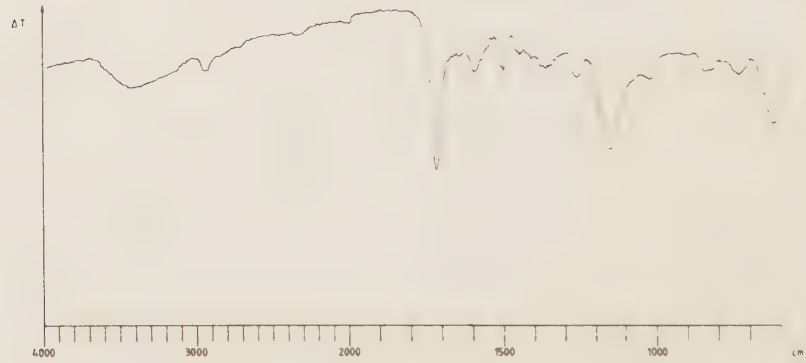
12. HAL II aus Fichten-Holocellulose

13. LAC 1

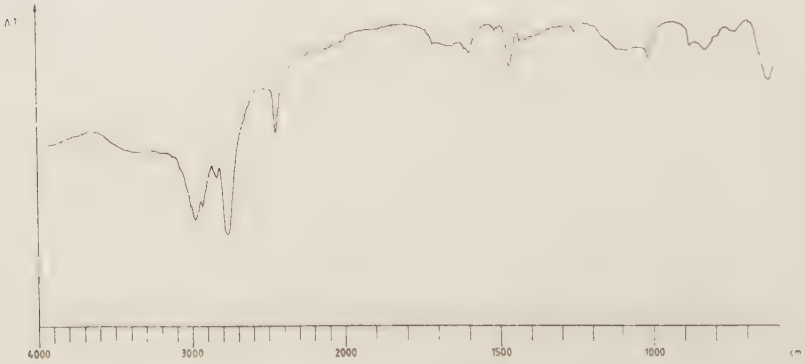
14. LAC 2



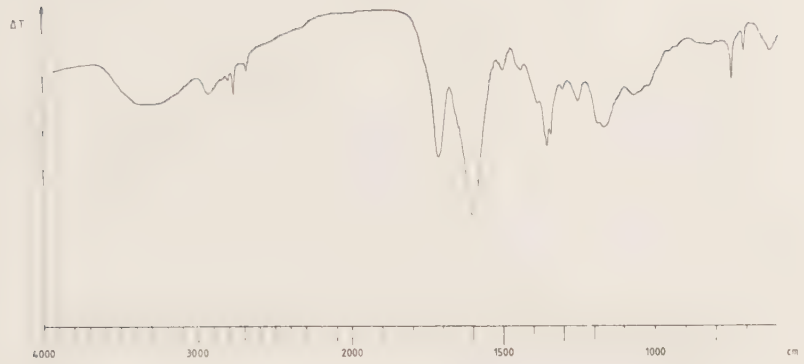
15. LAC 3



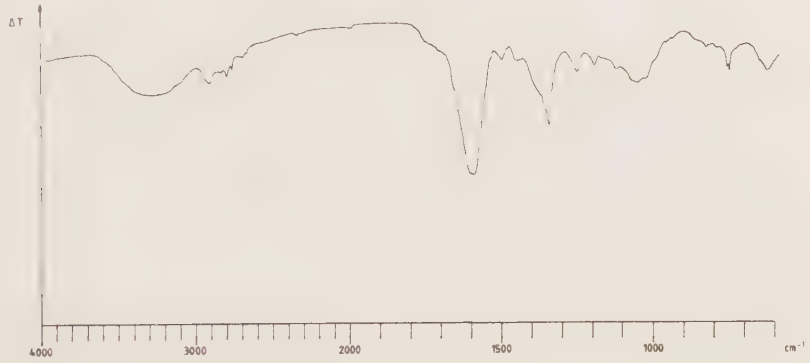
16. LAC 4



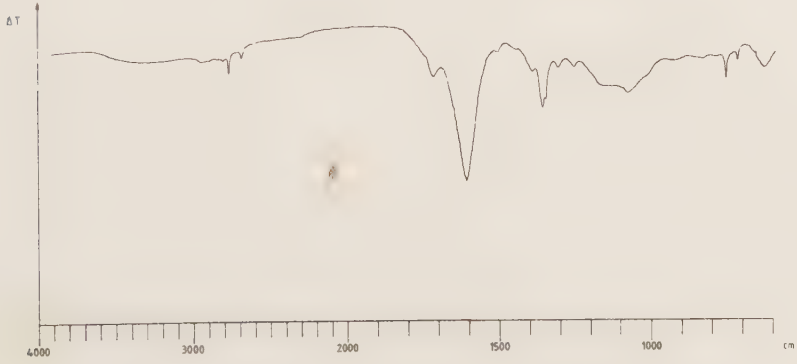
17. LAC 5



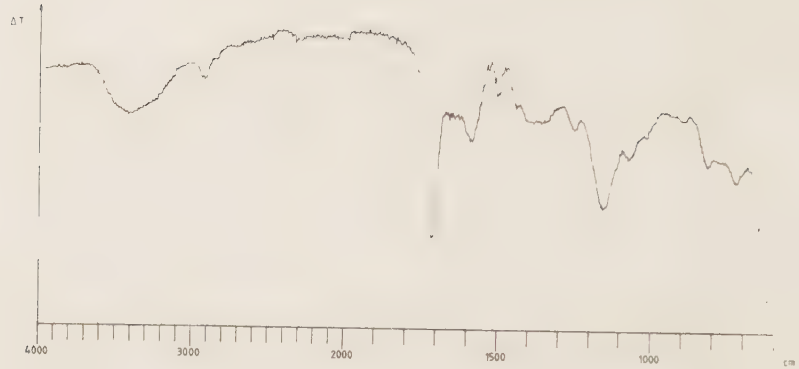
18. LAC 6



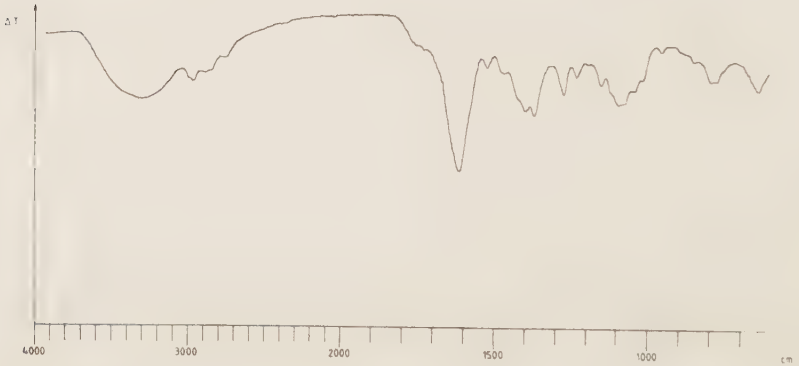
19. LAC 7



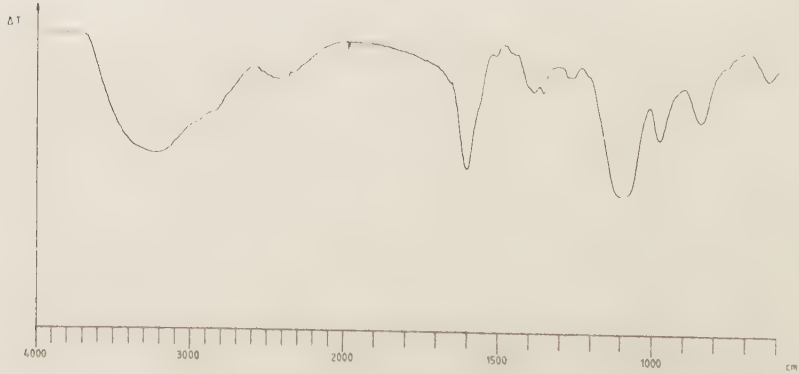
20. LAC 8



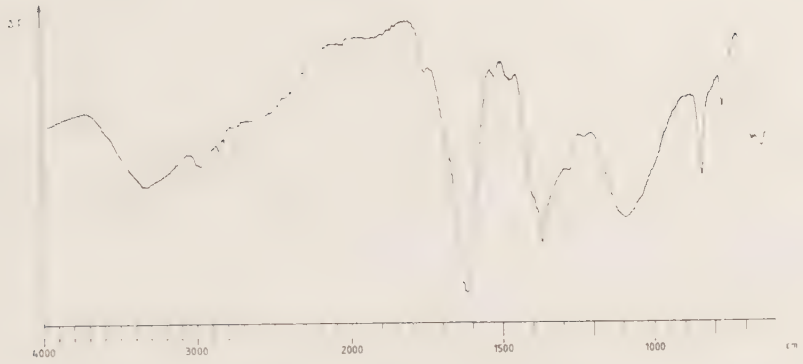
21. LAC 9



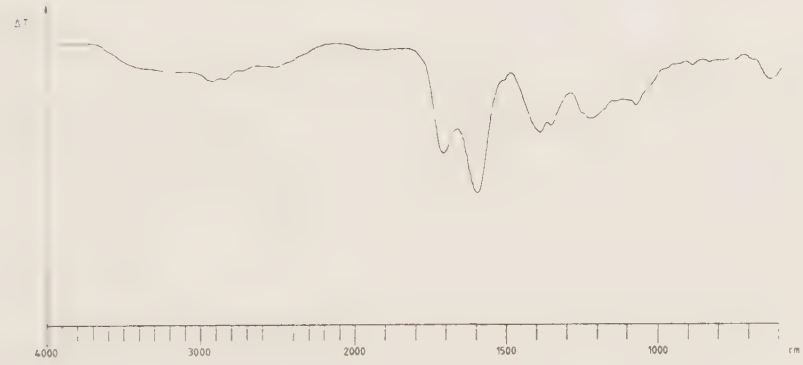
22. LAC 10



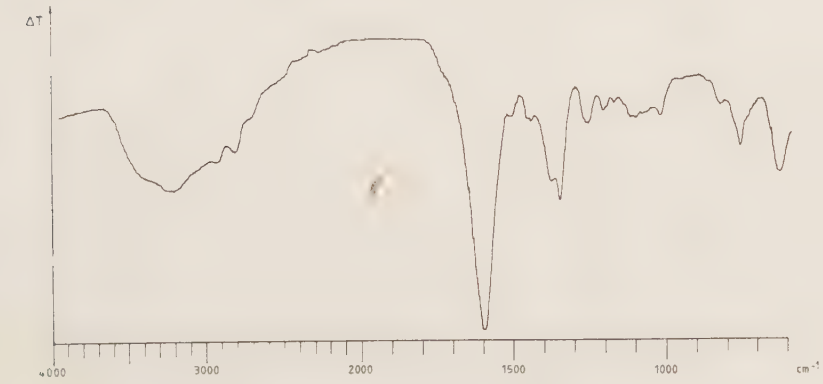
23. LAC 11



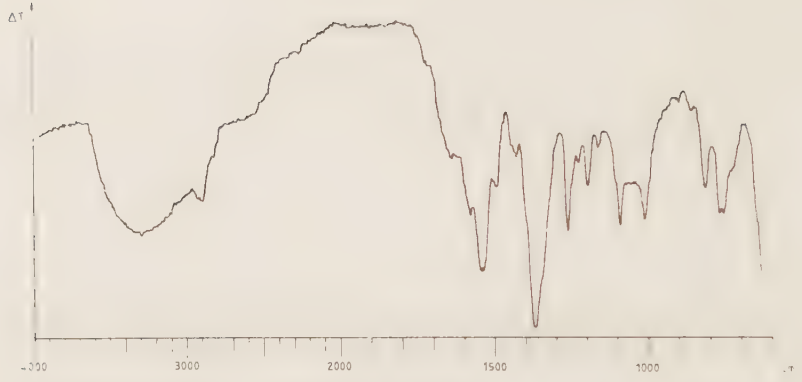
24. LAC 12



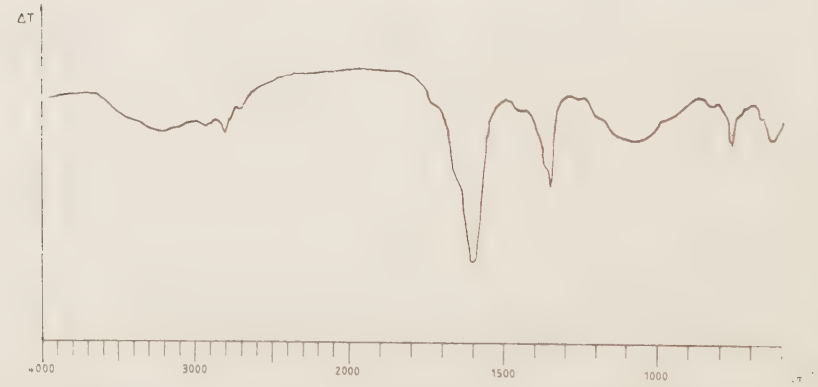
25. LAC 13



26. Fraktion 4 aus P 2 - Trennung von LAC 6

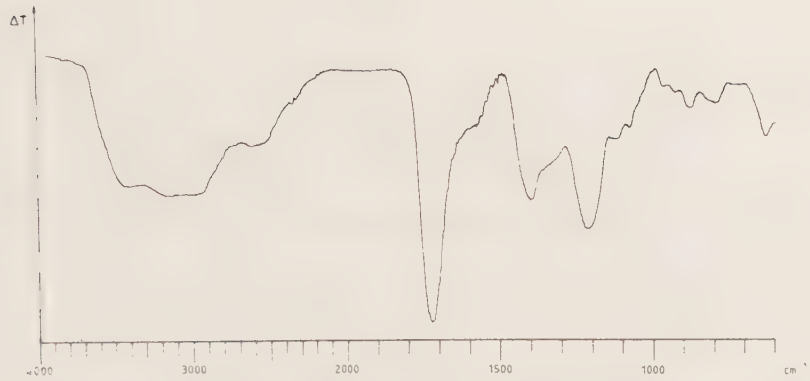


27. Fraktion 3 aus P 2 - Trennung von LAC 6

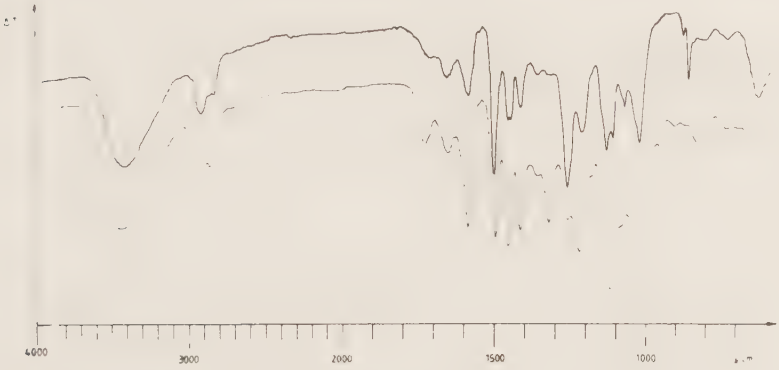


28. Fraktion 1+2 aus P 2 - Trennung von LAC 6

29. Fraktion LAC 10 K 2 (aus Kationenaustauscher-Trennung von LAC 10)



30. Fraktion LAC 10 K 6 (aus Kationenaustauscher-Trennung von LAC 10)



31. MWL aus Fichte (oben) und Buche

9. Literatur

Adler, E.:
Lignin chemistry - past, presence and future.
Wood Sci. Technol. 11, 169-218 (1977)

Albersheim, P., W. Diez Bauer, K. Keestra, K.W. Talmadge:
The structure of cell walls of suspension cultured sycamora cells.
Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides 117-128
(Hrsg. F. Loewus), New York 1973

Anderson, S.I., O. Samuelson:
Hypochlorit bleaching of birch xylan.
Svensk. Papperstidn. 81, 79-84 (1978)

Alibert, G., A. Boudet:
Lignification process in poplar. 1. Methods of quantitative estimation and monomer analysis of lignins. 2. Quantitative estimation of metabolic fluxes involved in the biosynthesis of lignin monomers.
Physiol. Veget. 17, 67-74, 75-79 (1979)

April, G.C., M.M. Kamal, J.A. Reddy, G.H. Bowers, S.M. Hansen:
Delignifizierung mit wäßrig-organischen Lösungsmitteln.
TAPPI 62, 83-85 (1979)

Aspinall, G.O.:
Carbohydrate polymers in plant cell walls.
Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides 95-116
(Hrsg. F. Loewus), New York 1973

Bauer, H.:
Strukturaufklärung und metallkatalysierte Isomerisierungsreaktionen bei Kohlenhydraten.
Diss. Univ. Tübingen (1975)

Bernardi, G.:
Chromatography of proteins on hydroxylapatite.
Methods in Enzymology XXII, 325-339 (1971)

Bezuch, B., J. Polcin:
The structure of milled wood and enzymatically isolated lignin fractions from spruce wood.
Cellul. Chem. Technol. 12, 473,482 (1978)

Bir Mullick, D.:
The non-specific nature of defense in bark during wounding, insect and pathogen attack.
In: The structure, biosynthesis and degradation of wood.
Rec. Adv. Phytochem. 11 (Hrsg. F.A. Loewus, V.C. Runeckles),
New York 1977

Björkman, A.:
Studies on finely divided wood. Part 3: Extraction of lignin-carbohydrate complexes with neutral solvents.
Svensk Papperstidn. 60, 243-251 (1957)

Blažej, A., L. Šutý, M. Košik, P. Krkoška, E. Golis:
Chemie des Holzes.
Bratislava 1975, deutsche Übers. Leipzig 1979

Bolker, H.J.:
A lignin-carbohydrate bond as revealed by infrared spectroscopy.
Nature 197, 489-490 (1963)

Brobst, K.M., H.D. Scobell, E.M. Steele:
Analysis of carbohydrate mixtures by liquid chromatography.
Amer. Soc. Brew. Che. Proc. 1973, 43-46 (1973)

Brown, M., W. Herth, W. Franke, D. Romanowicz:
The role of the golgi apparatus in the biosynthesis and secretion of a cellulosic glycoprotein in pleurochrysis: a model system for the synthesis of structural polysaccharides.
Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides, 207-258 (Hrsg. F. Loewus), New York 1973

Brownell, H.H.:
Pimproved ball milling in the isolation of a milled wood lignin.
TAPPI 51, 298-300 (1968)

Brownell, H.H.:
Stability of the lignin-carbohydrate complex.
TAPPI 54, 66-71 (1971)

Brunow, G., K. Lundquist:
Comparison of a synthetic dehydrogenation polymer of coniferyl alcohol with milled wood lignin from spruce, using ^{1}H NMR-spectroscopy.
Paperi ja Puu 11, 669-672 (1980)

Carlier, G.:
Production de glucose par hydrolyse enzymatique de la cellulose dégradée par voie chimique.
Annales de Recherches Sylvicoles 1978, AFOCEL 493-503 (1979)

Catesson, A.M., Y. Czaninski, B. Monties:
Histochemical characterisation of cell wall peroxidase during lignification.
Compt. Rend. 286, 1787-1790 (1978)

Chang, H.M., G.G. Allan:
"Oxidation". In: Lignins (Hrsg. K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig)
New York 1971

Cho, N.S., J.Y. Lee, G. Meshitsuka, J. Nakano:
On the characteristics of hardwood compound middle lamella lignin.
Mokuzai Gakkaishi 26, 537-5 (1980)

Connors, W.J.:
Gel chromatography of lignins, lignin model compounds and polystyrenes using sephadex LH-20.
Holzforschung 32, 145-147 (1978)

Connors, W.J., S. Sarkanen, J.L. McCarthy:
Gel chromatography and association complexes of lignin.
Holzforschung 34, 80.85 (1980)

Delmer, D.P.:
The biosynthesis of cellulose and other plant cell wall polysaccharides.
In: The structure, biosynthesis and degradation of wood.
Rec. Adv. Phytochem. 11 (Hrsg. F.A. Loewus, V.C. Runeckles)
New York 1977

Dietrichs, H., K. Garves, D. Behrensdorf, M. Sinner:
Untersuchungen über die Kohlenhydrate der Rinden einheimischer Holzarten.
Holzforschung 32, 60-67 (1978)

Ebert, G.:
"Biopolymere".
Darmstadt 1980

Elbein, A.D., W.T. Forsee:
Studies on the biosynthesis of cellulose.
Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides 259-298
(Hrsg. F. Loewus), New York 1973

Elbein, A.D.:
The role of lipid-linked saccharides in the biosynthesis of complex carbohydrates.
Ann. Rev. Plant. Physiol. 30, 239-772 (1979)

Erickson, M., S. Larson, G.E. Miksche:
Zur Struktur des Lignins der Fichte.
Act. Chem. Scand. 27, 903-914 (1973)

Erickson, M., G.E. Miksche:
Modellversuche zur Bildung des Lignins.
Act. Chem. Scand. 26, 3085-3096 (1972)

Ericsson, Th., G. Petersson, O. Samuelsson:
Galacturonic acid groups in birch xylan.
Wood Sci. Technol. 11, 219-223 (1977)

Eriksson, Ö., D.A.I. Goring, B.O. Lindgren:
Structural studies on the chemical bonds between lignins and carbohydrates in spruce wood.
Wood Sci. Technol. 14, 267-279 (1980)

Eriksson, Ö., B. Lindgren:
About the linkage between lignin and hemicelluloses in wood.
Svensk. Papperstidn. 80, 59-63 (1977)

Evliya, H., A. Olcay:
Oxidative polymerisation of isoeugenol and mild oxidation of synthetic polymers with alcaline cupric hydroxide.
Holzforschung 28, 130-135 (1974)

Faix, O.:
Zur ganzheitlichen Betrachtungsweise ligninalalytischer Kenndaten.
Papier 30, V1-V10 (1976)

Faix, O., G. Besold:
Herstellung und Charakterisierung von Dehydrierungspolymerisaten von p-Hydroxy-Zimtalkoholen (DHPs) unter besonderer Berücksichtigung von reinem 4-Hydroxy-Phenyl, Guajacyl- und Syringyl-propan-Polymerisaten.
Holzforschung 32, 1-7 (1978)

Faix, O., W. Schweers:
Vergleichende Untersuchungen an Polymermodellen des Lignins (DHPs) verschiedener Zusammensetzungen.
3. IR-spektroskopische Untersuchungen.
Holzforschung 28, 94-98 (1974)

Feingold, D.S., Der Fong Fan:
Biosynthesis of D-xylose and l-arabinose in plants.
Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides 69-84
(Hrsg. F. Loewus), New York 1973

Fengel, D.:
Ultrastructural behavior of cell wall polysaccharides.
TAPPI 53, 497-503 (1970)

Fengel, D.:
Ideas on the ultrastructural organisation of the cell wall components.
J. Polym. Sci., Part c, 36, 383-392 (1971)

Fengel, D.:
Fraktionierungsversuche am Alkali-Extrakt aus Fichten-Holocellulose. Teil I: Elektrophorese, Gelchromatographie, Ionenaustauschchromatographie.
Holzforschung 30, 73-78 (1976 a)

Fengel, D.:
Fraktionierungsversuche am Alkali-Extrakt aus Fichten-Holocellulose. Teil II: Optimierung der ionenaustauschchromatographischen Methoden.
Holzforschung 30, 143-148 (1976 b)

Fengel, D.:
Vorlesung über Chemie des Holzes (Teil I).
Univ. München (1977)

Fengel, D.:
Über die fibrilläre Struktur von Cellulose aus Holz.
Holzforschung 32(2), 37-44 (1978)

Fengel, D.:
Composition and structure of polyoses and lignin-polysaccharide complexes from spruce wood.
Cellul. Chem. Technol. 13, 279-297 (1979 a)

Fengel, D.:
Untersuchungen zur Existenz von Lignin-Polysaccharid-Komplexen in Fichtenholz.
Wochenbl. Papierfabr. 107, 136-137 (1979 b)

Fengel, D., D. Grosser:
Chemische Zusammensetzung von Nadel- und Laubhölzern.
Holz Roh- Werkst. 33, 32-34 (1975)

Fengel, D., M. Przyklenk:
Studies on the supermolecular structure of cell wall components. Part 4: Composition of the fractions from ion exchange chromatography.
Svensk Papperstidn. 78, 617-620 (1975)

Fengel, D., M. Przyklenk:
Studies on the alcali-extract from beech holocellulose.
Wood Sci. Technol. 10, 311-320 (1976)

Fengel, D., M. Przyklenk, G. Wegener:
Hydrolyse von Polysacchariden mit Trifluoressigsäure.
Papier 30, 240-243 (1976)

Fengel, D., G. Wegener:
Hydrolysis of polysaccharides with trifluor-acetic acid and its application to rapid wood and pulp analysis.
Advances in Chemistry Series 181, 145-158 (1979)

Fengel, D., G. Wegener, A. Heizmann, M. Przyklenk:
Trifluoressigsäure zur schnellen und schonenden Hydrolyse von Cellulose und anderen Polysacchariden.
Holzforschung 31, 66-71 (1977)

Fengel, D., G. Wegener, J. Feckl:
Untersuchungen an einigen technischen und analytischen Lignin. Teil I.
Holzforschung 35 im Druck (1981)

Fengel, D., G. Wegener, J. Feckl:
Untersuchungen an einigen technischen und analytischen Lignin. Teil II.
Holzforschung 35 im Druck (1981)

Ferrus, L., P. Pagés:
Water retention value and degree of cristallinity by infrared absorption spectroscopy in caustic-soda-treated cotton.
Cellul. Chem. Technol. 11, 633-637 (1977)

Fischer, L.:
Gel filtration chromatography.
Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Hrsg. T.S. Work, R.H. Burdon), Vol. 1, Part II, Amsterdam 1980

Fišerová, M., L. Šutý:
Comparative studies on milled wood lignins and cellulolytic enzyme lignin of beech wood (fagud sylvatica L.).
Cellul. Chem. Technol. 14, 283-252 (1980)

Franz, G.:
Biosynthese von Cellulosen und Hemicellulosen.
Papier 32, 521-525 (1978)

Freudenberg, K., G. Grion:
Beitrag zum Bildungsmechanismus des Lignins und der Lignin-Polysaccharid-Bindung.
Chem. Ber. 92, 1355-1363 (1959)

Freudenberg, K., J.M. Harkin:
Modell für die Bindung des Lignins an die Kohlenhydrate.
Chem. Ber. 93, 2814-2819 (1960)

Freudenberg, K., A.C. Neish:
Constitution and biosynthesis of lignin.
Molekularbiologie, Biochemie und Biophysik, 2 (Hrsg. A. Kleinzeller, G.F. Springer, H.G. Wittmann), Berlin, Heidelberg 1969

Fukuda, K., A. Hamada:
Purification and chemical characterisation of polysaccharides obtained from lampteromyces japonicus by concanavalin-A-sepharose affinity chromatography.
Biochim. Biophys. Acta 538, 580-592 (1978)

Fukuda, T., T. Nimemura, N. Terashima:
Studies on the chemical composition of brittleheart.
II. Sugar composition of hemicelluloses from brittleheart.
Mokuzai Gakkaishi 25, 55-60 (1979)

Gagnaire, D., D. Robert:
A polymer model of lignin (DHP), ^{13}C selectively labelled at the benzylic position; synthesis and NMR studies.
Makromol. Chem. 178, 1477-1495 (1977)

Glasser, W.:
Polymeric characteristics of isolated lignin fragments.
Veröffentlichung in Vorbereitung (1981)

Glasser, W., C.A. Barnett:
The structure of lignins in pulps. II. A comparative evaluation of isolation methods.
Holzforschung 33, 78-86 (1979 a)

Glasser, W., C.A. Barnett:
The structure of lignins in pulps. III. The assoziation of isolated lignins with carbohydrates.
TAPPI 62 (8), 101-105 (1979 b)

Glasser, W., H.R. Glasser:
Simulation of reactions with lignin by computer (SIMREL).
II. A model for softwood lignin.
Holzforschung 28, 5-11 (1974)

Glinski, A.J., A. Nichols:
Peroxiacatic acid delignification of white birch and new evidence for lignin-carbohydrate bonds.
Paperi ja Puu 59, 745-760 (1977)

Goldschmidt, O.:
"Ultraviolet spectra". In: Lignins (Hrsg. K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig), New York 1971

Goldstein, I.S.:
The hydrolysis of wood.
TAPPI 63 (9), 141-143 (1980)

Gordon, A.J., B.D.E. Gaillard:
The relation between lignin and carbohydrate in hemicellulos A, B, and C fractions extracted from lucerne and wheatstraw with alcali.
Misc. Pap. Landbuowhogesch. Wageningen 1976 (12), 55-65 (197

Goring, D.A.I.:
"Polymer properties of lignin and lignin derivatives".
In: Lignins (Hrsg. K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig), New York 1971

Grisebach, H.:
Biochemistry of lignification.
Naturw. 64, 619-625 (1977)

Gromov, V.S., A.M. Evdokimov, Ts.S. Abramovich, Yu.S. Khrol:
Issledovanie raspredliniya lignina v drevesine i topokhimii ee delignificatsii metodom UF-microspectrofotometrii.
1. Raspredelenie lignina v kletochnykh stenkhak trakheal'nykh elementov berezovoi drevesini.
Khim. Drev. 1977 (6), 73-79 (1977)

Groß, G.G.:
"Biosynthesis of lignin and related monomeres".
In: The structure, biosynthesis and degradation of wood.
Rec. Adv. Phytochem. 11 (Hrsg. F.A. Loewus, K.V. Runeckles), New York 1977

Groß, G.G.:
Recent advances in the chemistry and biochemistry of lignin.
Rec. Adv. Phytochem. (Hrsg. T. Swain, J.B. Harborne, C.F. Sumere) 12, 177-220 (1979)

Hahlbrock, K., H. Grisebach:
Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids.
Ann. Rev. Plant. Physiol. 30, 105-130 (1979)

Haliwell, B.:
Lignin synthesis: the generation of hydrogenperoxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese-II and phenole.
Planta 140, 81-88 (1978)

Hardell, H.L., G.J. Leary, M. Stoll, U. Westermark:
Variations in lignin structure in defined morphological parts of spruce.
Svensk Papperstidn. 83, 44-49 (1980)

Hardell, H.L., G.J. Leary, M. Stoll, U. Westermark:
Variations in lignin structure in defined morpholocigal parts of birch.
Svensk Papperstidn. 83, 71-74 (1980)

Harkin, J.M., J.R. Obst:
Interactions between lignin and cellulose in organic liquid and saline density gradient columns.
Wood and Fiber 343-348 (1973)

Hemmingson, J.A., G.A. Leary, I.D. Miller, W.A. Thomas, A.D. Woodhouse:
A new class of linkage between carbohydrates and lignin model compounds.
J. Chem. Soc., Chem. Comm. 1978, 92-93 (1978)

Hergerth, A.:
"Infrared spectroscopy".
In: Lignins (Hrsg. K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig), New York 197

Herrick, F.W., H.L. Hergert:
Utilisation of chemicals from wood: retrospects and prospects
Rec. Adv. Phytochem. 11 (Hrsg. F.A. Loewus, V.C. Runeckles), New York 1977

Highley, T.L.:
Degradation of cellulose by culture filtrates of poria placenta.
Mater. Org. 12(3), 161-174 (1977)

Higuchi, T.:
Formation and biological degradation of lignins.
Advances in Enzymology 34, 207-277 (1971)

Higuchi, T., K. Ogino, M. Tanahashi:
Effect of polysaccharides on dehydropolymerisation of coniferylalcohol.
Wood Res. 51, 1-11 (1971)

Hofmann, H.P., G. Zundel:
Quantitative spectroscopy - reproducible production of thin layers on supports from solutions.
Review of Scientific Instruments 42, 1727 (1971)

Hrutfiord, B.F.:
"Reduction and hydrogenolysis".
In: Lignins (Hrsg. K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig), New York 197

Ishihara, M., K. Shimizu, T. Ishihara:
Hemicellulases of brown rotting fungus Tyromyces palustris. III. Partial purification and mode of action of an extracellular xylanase.
Mokuzai Gakkaishi 24, 108-115 (1978)

Jayme, G., P.K. Tio:
Infrarotspektroskopische Untersuchungen an Polysacchariden und ihren Derivaten.
Papier 22, 322-328 (1968)

Johannson, B., G. Miksche:
Über die Benzylätherbindung im Lignin: II. Versuche an Modellen.
Act. Chem. Scand. 26, 289-308 (1972)

Johansson, M.H., O. Samuelson:
Alkaline destruction of birch xylan in the light of recent investigations of its structure.
Svensk Papperstidn. 80, 519-524 (1977)

Johansson, M.H., O. Samuelson:
Reducing end groups in birch xylan and their alkaline degradation.
Wood Sci. Technol. 11, 251-263 (1977)

Johnson, D.B., W.E. Moore, L.C. Zank:
The spectrometric determination of lignin in small wood samples.
TAPPI 44, 793-798 (1961)

Jones, J.K.N.:
Hemicelluloses in hardwoods growing on southern pine sites.
Wood and Fiber 9, 295-307 (1978)

Kaden, Th., H. Siegel:
Zur Kinetik des Cu^{2+}-Äthylendiamin-katalysierten H_2O_2-Zerfalls
Helv. Chim. Act. 51, 947-954 (1968)

Karklins, V., E.E. Okherina:
Infrarot-Spektren des Holzes und seiner Hauptbestandteile. IX. Grundlagen für die quantitative Interpretation der Infrarot-Spektren von Birkenholz. (Russ.)
Khim. Drev. 1975 (4), 3-10 (1975)

Katayama, Y., N. Morohoshi, T. Haraguchi:
Formation of lignin-carbohydrate-complex in enzymic dehydrogenation of coniferyl alcohol. I. Detection of acid-hydrolyzable linkage between D-Glucose and dehydrogenation products of coniferylalcohol.
Mokuzai Gakkaishi 26, 358-362 (1980)

Katayama, Y., N. Morohoshi, T. Haraguchi:
Formation of lignin carbohydrate complex in enzymatic dehydrogenation of coniferyl alcohol. II. Isolation of lignin-carbohydrate complex with guaiacylglycerol-ß-coniferyl ether or other dimeric compound as lignin moiety.
Mokuzai Gakkaishi 26, 414-420 (1980)

Katritzky, A.R., R.D. Topsom:
Infrared intensities: A guide to intramolecular interactions in conjugated systems.
Chem. Rev. 1977, 639-658 (1977)

Kayama, Y., F. Nakatsubo, T. Higuchi:
Synthesis of a trimeric lignin model compound composed of ß-O-4 and syringaresinol substructures.
Mokuzai Gakkaishi 26, 471-475 (1980)

Kerr, A.J., D.A.I. Goring:
The ultrastructural arrangement of the wood cell wall.
Cellul. Chem. Technol. 9, 563-573 (1975)

Kirk, T.K., W. Brown, E.B. Cowling:
Preparative fractionation of lignin by gel-permeation chromatography.
Biopolymers 7, 135-153 (1969)

Kirk, T.K., W.J. Connors, J.G. Zeikus:
"Advances in understanding the microbiological degradation of lignin".
In: The structure, biosynthesis and degradation of wood.
Rec. Adv. Phytochem. 11 (Hrsg. F.A. Loewus, V.C. Runeckles), New York 1977

Kleinert, Th.:
Lignin grafting onto cellulose during alcaline pulping.
Holzforschung 19, 179-183 (1965)

Kolar, J.J., B.O. Lindgren, Trubuvan Kumar Roy:
About the distribution of syringyl and guaiacyl residues in birch lignin.
Cellul. Chem. Technol. 13, 491-499 (1979)

Koshijima, T., R. Tanaka:
The presence of acetyl glucomannan in Björkman lcc.
Mokuzai Gakkaishi 16, 399-400 (1970)

Koshijima, T., T.T. Taniguchi, P. Tanaka:
Lignin-carbohydrate-complex. Part I: The influence of milling of wood upon the Björkman LCC.
Holzforschung 26, 211-217 (1972)

Koshijima, T., F. Yaku, R. Tanaka:
Fractionation of Björkman LCC from pinus densiflora.
Applied Polymer Symposium 28, 1025-1039 (1976)

Košiková, B., D. Joniak:
Stability of glycosidic type lignin-carbohydrate bonds against acid and alcali catalysed hydrolysis.
Cellul. Chem. Technol. 10, 695-701 (1976)

Košiková, B., D. Joniak, L. Košaková:
On the properties of benzyl ether bonds in the lignin-saccharide complex isolated from spruce.
Holzforschung 33, 11-14 (1979)

Košiková, B., D. Joniak, J. Skamla:
Lignin-Carbohydrate bonds in beech wood.
Cellul. Chem. Technol. 6, 579-588 (1972)

Košiková, B., J. Polčin, M. Dándarová-Vacátková:
Eine neue Methode zur Isolierung des Ligninsaccharid-Komplexes.
Holzforschung 23, 37-43 (1969)

Košiková, B., J. Polčin, M. Dándarová-Vašátková, D. Joniak:
Untersuchung des Bindungscharakters des Lignin-Polysaccharid-Komplexes, isoliert aus methyliertem Holz.
Holzforschung 23, 43-47 (1969)

Košiková, B., J. Polčin, D. Joniak:
NMR-studies on lignin-carbohydrate complexes.
Holzforschung 27, 53-64 (1973)

Košiková, B., J. Polčin, D. Joniak:
Isolation and properties of the lignin-saccharidic complex in acetylated beech wood.
Cellul. Chem. Technol. 7, 605-611 (1973)

Košiková, B., J. Polčin, D. Joniak:
NMR-studies on the lignin-saccharidic complexes. II. Hydrolysis of the lignin-saccharidic complex isolated from acetylated beechwood.
Holzforschung 31, 191-193 (1977)

Kosiková, B., L. Zakutna, D. Joniak:
Investigation of the lignin-polysaccharidic complex by electron microscopy.
Holzforschung 32, 15-18 (1978)

Kringstad, K.P., Ch.W. Cheng:
Studies on lignin-hemicellulose complexes.
TAPPI 52 (12), 2382-2385 (1969)

Krüger, G.:
Lignin, seine Bedeutung und Biogenese.
Chemie unserer Zeit 10 (1), 21-29 (1976)

Kuboi, T., Y. Yamada:
Regulation of the enzymic activities related to lignin synthesis in cell aggregates of tobacco cell culture.
Biochim. Biophys. Acta 542, 181-190 (1978)

Lai, Y.Z., K.V. Sarkanen:
"Isolation and structural studies".
In: Lignins (Hrsg. K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig), New York 1971

Lai, Y.Z., K.V. Sarkanen:
Structural variation in dehydrogenation polymers of coniferyl alcohol.
Cellul. Chem. Technol. 9, 239-245 (1975)

Leary, G.J.:
Quinone methides and the structure of lignin.
Wood Sci. Technol. 14, 21-34 (1980)

Leary, G., W. Thomas:
Reactive lignin intermediates. III. Competitive addition of simple hydroxy compounds and their conjugate bases to a quinone methide.
Tetrahedron Letters 42, 3631-3634 (1975)

Lindgren, B.:
The lignin-carbohydrate linkage.
Act. Chem. Scand. 12, 447-452 (1958)

Ludwig, C.H.:
"Magnetic resonance spectra".
In: Lignins (Hrsg. K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig), New York 1971

Lundquist, K., B. Josefson, G. Nyquist:
Analysis of lignin-products by fluorescence-spectroscopy.
Holzforschung 32, 44-47 (1978)

Lundquist, K., T. Olsson:
NMR-studies of lignins: Part 1: Signals due to protons in formyl groups.
Acta Chem. Scand. B 31, 788-792 (1977)

Lundquist, K., R. Simonson, K. Tingsvik:
Studies on lignin carbohydrate linkages in milled wood lignin preparations.
Svensk Papperstidn. 83, 452-455 (1980)

Lundquist, K., B. Wesslen:
Gel filtration of lignin model compounds.
Acta Chem. Scand. 25, 1920-1922 (1971)

Lyubanskii, B.P., V.B. Kogan, A.A. Baram:
Studie zur Kinetik der Extraktion von löslichen Bestandteilen aus Lärchenholz. (Russ.)
Zh. Prikl. Khim. (Leningrad) 51 (2), 381-385 (1978)

Mader, M., P. Schloß:
Isolation of malate dehydrogenase from cell-walls of nicotiana tabaccum.
Plant. Sci. L. 17, 75 (1979)

Marchessault, R.L., F.F. Morehead, N.M. Walter, C.P.G. Glendemans, T.E. Timell:
Morphology of Xylan single cristals.
J. Polym. Sci. 51, 66-68 (1961)

Marcinowski, S., H. Falk, D.K. Hammer. B. Hoyer, G. Grisebach:
Appearance and localisation of a ß-glucosidase hydrolyzing coniferin in spruce (picea abies) seedlings.
Planta 144, 161-165 (1979)

Marcinowski, S., H. Grisebach:
Enzymology of lignification. Cell wall bound ß-glycosidase for coniferin from spruce (picea abies) seedlings.
Eur. J. Biochem. 87, 37-44 (1978)

Mark, H.:
Fifty years of cellulose research.
Cellul. Chem. Technol. 14, 569-581 (1980)

Merewether, J.W.T., L.A.M. Samsuzzaman :
Studies on a lignin-carbohydrate complex. Part I: The isolation of a water soluble lignin-carbohydrate-complex from alcali-extraction of eucalyptus obliqua.
Holzforschung 26, 11-18 (1972)

Merewether, J.W.T., L.A.M. Samsuzzaman , I.C. Calder:
Studies on a lignin-carbohydrate complex. Part II: Characterisation of the water-soluble lignin-carbohydrate complex.
Holzforschung 26, 180-185 (1972)

Merewether, J.W.T., L.A.M. Samsuzzaman , R.G. Cooke:
Studies on a lignin-carbohydrate-complex. Part III: Nature of the complex.
Holzforschung 26, 194-197 (1972)

Meyer, H.:
On the structure of cell walls and cell wall mannans from ivory nuts and from dates.
Biochim. Biophys. Acta 28, 229-240 (1958)

Morohoshi, N., W.G. Glasser:
The structure of lignins in pulps. Part 4: Comparative evaluation of five lignin de-polymerisation techniques.
Wood Sci. Technol. 13, 165-178 (1979)

Morrison, I.M.:
Isolation and analysis of lignin-carbohydrate complexes from lolium multiflotum.
Phytochem. 13, 2979-2984 (1973)

Mouttet, B., A. Robert:
Misé en évidence de complexes lignin-polysaccharides dans la membrane de tiges de sequoia sempervirens cultivées in vitro.
Holzforschung 32, 173-177 (1978)

Nakatsubo, F., T. Higuchi:
Enzymic dehydrogenation of p-coumaryl-alcohol. I. Structure of dimeric compounds.
Holzforschung 29, 64-68 (1975)

Nakatsubo, F., K. Sato, T. Higuchi:
Enzymic dehydrogenation of p-coumaryl alcohol. IV. Reactivity of quinomemethide.
Mokuzai Gakkaishi 22, 29-33 (1976)

Nimz, H.:
Über ein neues Abbauverfahren des Lignins.
Chem. Ber. 102, 799-810 (1969)

Nimz, H.:
Spaltung von Ätherverbindungen durch benachbarte Mercaptogruppen; Modellversuche zum Ligninabbau mit Thioessigsäure.
Chem. Ber. 102, 3803-3817 (1969)

Nimz, H.:
Das Lignin der Buche. Entwurf eines Konstitutionschemas.
Angew. Chem. 86, 336-344 (1974)

Nimz, H., K. Das:
Niedermolekulare Spaltprodukte des Lignins. 2. Durch Abbau mit Thioessigsäure erhaltene dimere Abbauprodukte des Buchenlignins.
Chem. Ber. 104, 2359-2380 (1971)

Nimz, H., H. Lüdemann:
^{13}C-Kernresonanzspektren von Ligninen (5): Oligomere Ligninmodellsubstanzen.
Markomol. Chem. 175, 2577-2583 (1974)

Nimz, H., H.-D. Lüdemann:
Kohlenstoff-13-NMR-Spektren von Ligninen. 6. Lignin und DHP-Acetate.
Holzforschung 30, 34-40 (1976)

Nimz, H., I. Mogharab, H.D. Lüdemann:
^{13}C-Kernresonanzspektren von Ligninen (3): Vergleich von Fichtenlignin mit künstlichem Lignin nach Freudenberg.
Makromol. Chem. 175, 2563-2575 (1974)

Nimz, H., D. Robert, O. Faix, M. Nemr:
Carbon-13 NMR spectra of lignins. 8: Structural differences between lignin of hardwoods, softwoods, grasses and compression wood.
Holzforschung 35, 16-26 (1981)

Ohara, S., S. Hosoya, J. Nakano:
Studies on the formation of lignin-carbohydrate complex during alcaline pulping processes.
Mokuzai Gakkaishi 26, 408-413 (1980)

Ota, M.:
Studies on the constituents of the leaves of the bamboo grass sasa sp. 1. Isolation of hemicelluloses and preparation of carboxy-methyl hemicelluloses.
Res. Bull. of the Collage Experiment Forests Hokkaido Univ. XXXIV, 1, 97-118 (1977)

Ozols-Kalnins, V., J. Gravitis, P. Erins:
Die Polymer-Struktur des Lignins. III. Beschreibung der Kinetik von Modellverfahren für die Lignin-Biosynthese. (Russ.)
Khim. Drev. 1978 (3), 57-61 (1978)

Page, D.H.:
A note on the cell wall structure of softwood tracheids.
Wood and Fiber 7, 246-248 (1976)

Paul, K.G.:
Peroxidases.
In: The Enzymes (Hrsg. P.D. Boyer, H. Lardy, M. Myrbäck), Vol. 8, 227-274, New York 1963

Pew, J.C., W.J. Connors:
New structures from the enzymic dehydrogen-action of lignin model p-hydroxy-carbinols.
J. Org. Chem. 34, 580-585 (1969)

Pew, J.C., P. Weyna:
Fine grinding, enzyme digestion, and the lignin cellulose-bond in wood.
TAPPI 45, 247-256 (1962)

Pivovarova, V.A., B.D. Bogomolov:
Kolichestvennoe opredelenie uglevodov'v lignouglevodnykh komplexsakh anthronovym metodom.
Khim. Drev. 1977 (2), 45-47 (1977)

Pivovarova, V.A., B.D. Bogomolov:
Issledovanie lignouclevodnykh komplexov drevesiny sosny metodom elektroforeza.
Khim. Drev. 1977 (2), 48-51 (1977)

Pla, F.M., P. Froment, R. Capitini, A.M. Tischtschenko, A. Robert:
Edute d'une lignine d'éxtraction par diffusion de la lumière avec source laser.
Cellul. Chem. Technol. 11, 711-718 (1977)

Plonka, A.M., W. Surewitz:
The evaluation of chlorite methods for isolating holocellulose from wood in view of the balance of its chemical components.
Cellul. Chem. Technol. 13, 511-522 (1979)

Polčin, J., B. Bezuch:
Investigations on enzymic hydrolysis of lignified cellulosic materials.
Wood Sci. Technol. 11, 275-290 (1977)

Polčin, J., B. Bezuch:
Enzymatic isolation of lignin from wood and pulps.
Wood Sci. Technol. 12, 149-158 (1978)

Reese, E.T.:
"Degradation of polymeric carbohydrates by microbial enzymes".
In: The structure, biosynthesis and degradation of wood.
Rec. Adv. Phytochem. 11 (Hrsg. F.A. Loewus, K.V. Runeckles), New York 1977

Robut, J.F.:
Mechanisms involved in the biosynthesis of polysaccharides.
TIBS 4 (2), 47-49 (1979)

Rouger, J., J.P. Mainguet:
Dégradation d'une lignine d'éxtraction par coupure réductive des liaisons éther.
Cellul. Chem. Technol. 12, 83-103 (1978)

Rozmarin, G., A. Donescu:
Reactivity of phenyl-propanoid precursors of lignin.
Cellul. Chem. Technol. 13, 747-751 (1979)

Runkel, R.O.H., K.D. Wilke:
Zur Kenntnis des thermoplastischen Verhaltens von Holz.
Zweite Mitteilung.
Holz Roh- Werkstoff 9, 260-270 (1951)

Sakakibara, A.:
"Degradation products of protolignin and the structure of lignin".
In: The structure, biosynthesis and degradation of wood.
Rec. Adv. Phytochem. 11 (Hrsg. F.A. Loewus, V.C. Runeckles), New York 1977

Sakakibara, A.:
A structural model of softwood lignin.
Wood Sci. Technol. 14, 89-100 (1980)

Sarkanen, K.V., H.M. Chang, G.G. Allan:
Species variations in lignins. III: Hardwood lignins.
TAPPI 50, 587-590 (1967)

Sarkanen, K.V., H.L. Hergert:
"Classification and distribution".
In: Lignins (Hrsg. K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig), New York 1971

Sarkanen, K.V., C.H. Ludwig:
"Definition and nomenclature".
In: Lignins (Hrsg. K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig), New York 1971

Schmidt, O.:
Über den bakteriellen Abbau der chemisch verholzten Zellwand.
Mater. Org. 15, 207-224 (1980)

Schurz, J.:
Chemistry in papermaking.
Cellul. Chem. Technol. 14, 775-784 (1980)

Scobell, H.D., K.M. Brobst, E.M. Steele:
Automated liquid chromatographic system for analysis of carbohydrate mixtures.
Cereal Chem. 54 (4), 905-917 (1977)

Sears, K.D., W.J. Alexander, O. Goldschmidt, J.K. Hamilton:
Characterisation of hemicellulose. Studies of representative pulps from Quebec black spruce and balsam fir.
TAPPI 61 (9), 105-110 (1978)

Sergeeva, L.L., A.V. Semenovskii, A.L. Mal'tseva, N.N. Shorgina:
Isolierung eines Lignin-Kohlenhydrat-Komplexes aus den Produkten des reduktiven Abbaus von Fichtenholz mit metallischem Natrium in flüssigem Ammoniak. (Russ.)
Khim. Drev. 1979 (3), 35-40 (1979)

Sergeeva, L.L., A.V. Semenovskii, A.L. Mal'tseva, N.N. Shorgina:
Gelchromatographische Untersuchung eines Lignin-Kohlenhydrat-Komplexes aus den Produkten des Abbaus von Fichtenholz mit metallischem Natrium in flüssigem Ammoniak. (Russ.)
Khim. Drev. 1979 (3), 41-44 (1979)

Shimizu, K., M. Hashi, K. Sakurai:
Isolation of a softwood xylan from two 4-O-methyl-d-glucuronic acid residues.
Carbohydr. Res. 62, 117-126 (1978)

Siegel, S.M.:
The biosynthesis of lignin: evidence for the participation of celluloses as sites for oxidative polymerisation of eugenol.
J. Am. Chem. Soc. 78, 1753-1755 (1955)

Sigel, H.:
Zur katalatischen und peroxidatischen Aktivität von Cu^{2+}-Komplexen.
Angew. Chem. 81, 161-174 (1969)

Simatupang, H.M., P. Hofmann, H. Augustin:
Einfluß der Versuchsbedingungen bei der Ionenaustausch-chromatographischen Bestimmung neutraler Zucker in Holz- und Zellstoffhydrolysaten.
Holz Roh- Werkstoff 34, 279-293 (1976)

Simson, B.W. T.E. Timell:
Polysaccharides in cambial tissues of populus tremuloides and tilia americana. I - IV.
Cellul. Chem. Technol. 12, 39-84 (1978)

Sjöström, E.:
The behavior of wood polysaccharides during alkaline pulping processes.
TAPPI 60, 151-154 (1977)

Slutzky, B., A.R. Lara, R. Lopéz-Planes:
Study of the monosaccharides and oligosaccharides in the chemical and enzymic hydrolyzates from bagasse and pitch.
Cellul. Chem. Technol. 14, 361-369 (1980)

Smelstorius, J.A.:
Chemical composition of wood of australian-grown pinus radiata. IV. Molecular weight of cellulose and polysaccharide-polysaccharide complexes.
Holzforschung 28, 101-108 (1974)

Solvin, J.R., G.G. Leppard:
Fibrillar, modified galacturonic acid in, on, and between plant cell walls.
Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides 315-332 (Hrsg. F. Loewus), New York 1973

Steege, H., B. Phillipp, R. Engst, G. Magister, H.J. Lewerenz, P. Bleyl:
Microcristalline cellulose powders: properties and possible applications in nutrition.
TAPPI 61 (5), 101-105 (1978)

Stoldere, I.A., J.A. Gravitis, P. Erins:
Ein oktaedrischer Eisen-Komplex als Oxidationsmittel für Modellversuche zur Ligninbildung. (Russ.)
Khim. Drev. 1978 (2), 20-26 (1978)

Strumila, G.B., W.H. Rapson:
Dynamik und Reaktionsprodukte der Chlordioxidoxidation von Acetovanillon.
Pulp Paper Canada 79 (6), 34-42 (1978)

Sudo, K., B.H. Wang, A. Sakakibara:
Hydrogenolysis of protolignin. XIV: Isolation of a dimeric compound with α-O-ß-linkage.
Mokuzai Gakkasihi 25, 61-66 (1979)

Sumi, Y., R. Hale, B. Ranby:
The accessibility of native cellulose mirofibrils.
TAPPI 46, 126-130 (1963)

Sundararajan, T.N., M. Wayman:
Determination of the molecular weight and molecular weight distribution of dehydrogenase polymers of coniferyl-alcohols and lignin.
J. Polym. Sc. 30, 521-531 (1970)

Tanahashi, M., T. Aoki, T. Higuchi:
Dehydrogenative polymerisation of monolignols by peroxidase and H_2O_2 in a dialysis tube. III. Formation of lignin carbohydrate complexes.
Mokuzai Gakkaishi 27, 116-124 (1981)

Tanaka, K., F. Nakatsubo, T. Higushi:
Reactions of Guaiacylglycerol-ß-guaiacyl ether with several sugars. I. Reaction of quinonemethide with d-glucuronic acid.
Mokuzai Gakkaishi 22, 589-590 (1976)

Tanaka, K., F. Nakatsubo, T. Higuchi:
Reaction of Guaiacylglycerol-ß-guaiacyl ether with several sugars. II. Reaction of quinonemethide with pyrohexanoses.
Mokuzai Gakkaishi 25, 653-659 (1979)

Taniguchi, T., H. Harada, K. Nakkoto:
Accessibility of hydroxyl-groups in wood.
Mokuzai Gakkaishi 12, 215-220 (1966)

Timell, T.E.:
Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses.
Wood Sci. Technol. 1, 45-70 (1967)

Wagner, H., H. Habermeier, G. Wegener:
Identifizierung von 6-Desoxyhexosen im Mikromaßstab.
Planta Medica 39, 135-139 (1980)

Wahba, M.:
Kinetics of the deuteration of cellulose. An infrared study with deuteriumoxide water vapors.
Chem. Scr. 11 (4-5), 158-163 (1977)

Walborg, E.F., R.S. Lantz:
Separation and quantification of saccharides by anion-exchange chromatography utilizing boric acid-glycerol-buffers.
Anal.Biochem. 22, 123-133 (1968)

Wayman, M., T.I. Obiaga:
Molecular weights of milled wood lignins.
TAPPI 57 (4), 123-126 (1974)

Wayman, M., T.I. Obiaga:
The modular structure of lignin.
Can. J. Chem. 52, 2102-2110 (1974)

Wegener, G.:
Beitrag zur Charakterisierung der Natriumchlorit-Delignifizierung von Fichtenholz. 1. Einfluß von Reaktionstemperatur, Reaktionszeit und Aktivchloreinsatz auf die Kenndaten der Delignifizierung.
Papier 28, 478-486 (1974)

Wegener, G.:
Beitrag zur Charakterisierung der Natriumchlorit-Delignifizierung von Fichtenholz: 2. Untersuchungen von Aufschlußlösungen unter besonderer Berücksichtigung ausgelöster Polysaccharide.
Papier 29, 429-437 (1975 a)

Wegener, G.:
Beitrag zur Charakterisierung der Chlorit-Delignifizierung von Fichtenholz.
Diss. Univ. München (1975 b)

Wegener, G.:
Beitrag zur Charakterisierung der Natriumchlorit-Delignifizierung von Fichtenholz. 3. Lignin-Polysaccharid-Komplexe in Chlorit-Aufschlußlösungen.
Papier 30, 177-185 (1976)

Wegener, G.:
(1980) unveröffentlicht.

Wegener, G., D. Fengel:
Studies on milled wood lignins from spruce. Part 1: Composition and molecular properties.
Wood Sci. Technol. 11, 133-145 (1977)

Wegener, G., D. Fengel:
Rapid ultrasonic isolation of milled wood lignins. Fractionation and degradation experiments.
TAPPI 62 (3), 97-100 (1979)

Wegener, G., M. Stoll:
Eine schnelle Isolierung von Milled Wood Lignin mit Hilfe von Ultraschall.
Cellul. Chem. Technol. 10, 611-616 (1976)

Weitkamp, H., R. Barth:
Einführung in die quantitative Infrarot-Spektroskopie.
Stuttgart 1976

Wise, L.E., E.K. Ratliff:
Quantitative isolation of hemicellulose and the summative analysis of wood.
Anal. Chem. 19,459-462 (1947)

van Zyl, J.D.:
Notes on the spectrophotometric determination of lignin in wood samples.
Wood Sci. Technol. 12, 251-259 (1978)

Vodnansky, J., M. Slabina, B. Schneider:
Investigation of the changes in composition and structure of cellulose and wood by infrared spectroscopy.
Coll. Czech. Chem. Com. 28, 3245-3255 (1963)

Yaku, F., Y. Yamada, T. Koshijima:
Lignin carbohydrate complex. Part III. Formation of micelles in the aqueous solution of acidic lignin-carbohydrate complex.
Holzforschung 33, 54-59 (1979)

Yaku, F., Y. Yamada, T. Koshijima:
Lignin-carbohydrate complex. Part II: Enzymic degradation of acidic polysaccharides in Björkman lcc.
Holzforschung 30, 148-156 (1976)

Yamasaki, T., K. Hata, T. Higuchi:
Chemical properties of enzymic dehydrogenation polymer from p-coumaryl alcohol.
Mokuzai Gakkaishi 18, 361-366 (1972)

Yamasaki, Y., K. Hata, T.Higuchi:
Separation of s-DHPs of a mixture of c- and s-DHPs with special reference to the isolation of syringyl-lignin.
Holzforschung 32, 20-32 (1978)

Zbankov, R.G., V.P. Komar, N.F. Ivanova, V.A. Kulakov, T.E. Kolosova, S.P. Firsov, D.K. Buslov, G.S. Bykova, V.V. Sivcik:
Möglichkeiten der IR-Spektroskopie bei der Untersuchung des physikalischen und chemischen Aufbaus der Cellulose und anderer Polysaccharide.
Faserforsch. Textiltechn. 26, 112-125 (1975)

Zundel, G.:
Easily polarizable hydrogen bonds - their interactions with the environment-IR continuum and anomalous proton conductivity.
In: The Hydrogen Bond (Hrsg. P. Schuster, G. Zundel, C. Sandorfy), Amsterdam 1976

Nachtrag

Fengel, D.:
Chemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an schonend isoliertem Nadelholzlignin.
Holzforschung 30, 1-6 (1976 c)

Fergus, B.J., A.R. Procter, J.A.N. Scott, D.A.I. Goring:
The distribution of lignin in spruce wood as determined by Ultraviolet Microscopy.
Wood Sci. Technol. 3, 117-138 (1969)

Fergus, B.J., D.A.I. Goring:
The distribution of lignin in birch wood as determined by ultraviolet microscopy.
Holzforschung 24, 118-124 (1970)

Kosiková, B.:
Isolierung eines Lignin-Polysaccharid-Komplexes aus der Holocellulose von methyliertem Fichten-Holz (slowak.)
Drevarsky Vîskum 18, 25-31 (1973)

Lebenslauf

Josef Feckl
geb. 26. Dezember 1949 in München
Eltern: Josef Feckl, Schreiner, und Lidwina, geb. Schmerbeck
1956 Eintritt in die Volksschule an der Tumblingerstraße in München
1960 Eintritt in das Theresiengymnasium in München
1970 Abitur (neusprachliches Gymnasium)
1970 Beginn des Studiums an der Universität München
1971 Beginn des Fachstudiums Chemie mit Studienziel Diplom an der Universität München
Oktober 1973 Diplomvorprüfung
Dezember 1975 Diplomhauptprüfung
Februar 1976 mit Januar 1977 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München (Arbeitsgruppe Prof.Dr. Klingenberg). Thema der Arbeit: "Versuche zur Charakterisierung des Adenin-Nucleotid-Carriers der inneren Mitochondrienmembran mit Hilfe Membran-impermeabler, aminosäurespezifischer Reagentien".
Juli 1977 bis November 1977 wiss. Hilfskraft am selben Institut.
Seit Dezember 1977 wiss. Mitarbeiter des Instituts für Holzforschung der Universität München.